

N° D'ORDRE
71

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Abel CHARNOT

*Diplômé de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Lyon
Pharmacien Aide-Major de 1^{re} Classe*

1^{re} THÈSE - Contribution à l'étude du sang de l'*Helix pomatia* L.

2^e THÈSE - Les Phytostérines - Les Feldspaths des roches

Soutenues le 4 Novembre 1925 devant la Commission d'examen.

MM. COUVREUR	<i>Président</i>
BEAUVIERE	} <i>Examineurs</i>
ROMAN F.	

LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

Téléphone 63-56

—
1925

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SANG
DE L'HELIX POMATIA L

N^o D'ORDRE
71

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Abel CHARNOT

*Diplômé de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Lyon
Pharmacien Aide-Major de 1^{re} Classe,*

1^{re} THÈSE - Contribution à l'étude du sang de l'*Helix pomatia* L

2^e THÈSE - Les Phytostérines - Les Feldspaths des roches

Soutenues le 4 Novembre 1925 devant la Commission d'examen.

MM. COUVREUR	{	<i>Président</i>
BEAUVÉRIE		<i>Examineurs</i>
ROMAN F.		

LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU
42, Quai Gailleton, 42
Téléphone 63-56

1925

UNIVERSITÉ DE LYON - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DEPÉRET, * O., * I., ✕, Membre de l'Institut.

Assesseur

M. KÖHLER, * O., * I., ✕ Corresp. de l'Institut.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, * I. — R. DUBOIS, *, * I., ✕ — GÉRARD * O., * I.
RIGOLLOT, *, * I. — VAUTIER, * I., — GOUY, * O., * I.,

Professeurs titulaires

MM. DEPÉRET, * O., * I., ✕, Membre de l'Institut, Professeur de *Géologie*.
KÖHLER, * O., * I., ✕, Professeur de *Zoologie agricole*.
OFFRET, *, * I., ✕, Professeur de *Minéralogie théorique et appliquée*.
LE VAVASSEUR, *, * I., Professeur de *Calcul différentiel et intégral*.
DULAC, *, * I., Professeur de *Mathématiques pures*.
MASCART, *, * I., ✕, *Astronomie physique*.
GRIGNARD, * O., * I., ✕, Correspondant de l'Institut, Professeur de
Chimie organique.
SIRE, * A., *Mécanique rationnelle et appliquée*.
COUVREUR, *, * I., Professeur de *Physiologie générale et comparée*.
MEUNIER, * O., I., Professeur de *Chimie industrielle*.
COUTURIER, * I., ✕, Professeur de *Chimie* Correspondant de l'Institut.
BEAUVERIE, *, * I., Professeur de *Botanique*.
THOVERT, *, * I., ✕, *Physique*.

Professeurs titulaires (sans chaire)

MM. VANEY, *, * I., *Zoologie*.
LOCQUIN, *, * I., *Chimie générale*.

Maîtres de conférences et Chargés de cours complémentaires

MM. DOUIN *Botanique*.
JOB, *Chimie physique*.
PIERRON, * I., *Chimie appliquée*.
DÉJARDIN, *Physique*.
RICHE, * I., *Géologie*.
BONNET, * I., *Zoologie appliquée et Zootechnie*.
ROMAN (F.), * I., *Géologie agricole*.
CHIFFLOT, * I., ✕, *Botanique*.
MAYET, *, * I., *Anthropologie*.
PELOSSE, * A., *Sériciculture*.
CLÉMENT, * I., ✕, *Physiologie*.
DONCIEUX, * I., *P. C. N. S.*
SEYEWETZ, * I., *Matières colorantes*.

Secrétaire

M. CLÈRE, * I.



A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

Pieux hommage de mon amour
filial.

A LA GLORIEUSE MÉMOIRE DE MON FRÈRE

MARCEL CHARNOT

Médecin auxiliaire au 63^e Régiment d'Infanterie

Tombé au Champ d'Honneur le 16 Avril 1917

A Berry-au-Bac

Son âme généreuse est le plus
doux souvenir de tendresse de mon
enfance.

A MON PÈRE

Sa vie entière de travail et de sacrifice est pour moi le plus précieux des exemples, qui me guidera toujours dans ma carrière. Je lui dédie ce travail, modeste témoignage de toute ma reconnaissance et de ma profonde affection.

A MES FRÈRES, A MES SŒURS

A TOUTE MA FAMILLE

A LA GLORIEUSE MÉMOIRE DE TOUTS MES CAMARADES TOMBÉS AU CHAMP D'HONNEUR

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE,
MONSIEUR LE PROFESSEUR COUVREUR

*Professeur de Physiologie générale et comparée
Chevalier de la Légion d'honneur*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BEAUVRIE

*Professeur de Botanique générale
Chevalier de la Légion d'honneur*

A MONSIEUR ROMAN

*Maître de Conférences,
Chargé du cours de Géologie agricole*

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LYON

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

A MES CHEFS, A MES MAÎTRES
DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE DE LYON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SANG DE L'HELIX POMATIA L

INTRODUCTION

Quoi qu'il soit très facile à obtenir à l'état de pureté satisfaisante, le sang de l'*Helix Pomatia L*, vulgairement appelé escargot de Bourgogne, n'a guère été étudié qu'au point de vue du pigment coloré, et, dans ce cas, les travaux ont trait pour la plupart aux propriétés physiques et en particulier spectroscopiques; mais l'étude de la composition chimique a été délaissée.

En effet, si de nombreuses publications approfondies sur les spectres d'absorption de l'hémocyanine et sur la fixation de certains gaz par ce pigment cuivrique ont vu le jour vers la fin du siècle dernier et au début de celui-ci, nous n'avons guère à citer que les travaux de M. le Professeur COUVREUR, de Mlle BELLION, et de M. SEILLIÈRE, sur le sucre du sang d'escargot comme étude hématologique chimique.

Nous avons étendu le champ des déterminations et nous nous sommes efforcés de déceler les principaux constituants chimiques de ce sang, que nous avons également envisagé, au point de vue physique.

Nous avons utilisé, dans ce double but, les nouvelles méthodes de mesures et de dosages, appliquées à l'hématologie humaine : méthodes tout à fait favorables, en raison de la faible quantité de sang, nécessaire pour les opérations à effectuer.

Dans le présent travail, nous avons étudié parallèlement, les variations des propriétés physiques et de la composition chimique du sang, dans les différents états de vie de l'*Helix pomatia* L, c'est-à-dire pendant sa vie active, et sa vie latente.

Pendant la vie active, l'animal doit nécessairement accumuler les éléments nutritifs et défensifs, pour pouvoir subsister pendant la vie latente.

Cette seconde vie peut apparaître en diverses circonstances :

1° En été, pendant les périodes de grandes sécheresses, qui la conditionnent, aussi ne se produit-elle pas nécessairement.

2° En hiver, où elle est toujours observée.

Nous diviserons notre étude en 3 parties :

1° ETUDE BIOLOGIQUE : caractères organoleptiques, coagulation, éléments figurés, etc...

2° ETUDE PHYSIQUE DU SANG : Dans les différents états, nous avons examiné les variations de la densité, de la viscosité, de la tension superficielle, de la conductibilité électrique, de l'abaissement cryoscopique, de la concentration ionique, puis l'action des rayons ultra-violets.

Pour l'étude spectroscopique, nous nous sommes contenté de rappeler les travaux de Charles DHÉRÉ.

3° ETUDE CHIMIQUE du sang.

Cette étude, la plus importante de notre travail, se divise elle-même en deux parties.

1° *Etude qualitative et quantitative des éléments minéraux.*

Nous avons rattaché à cette partie deux éléments : le soufre et le phosphore, qui entrent aussi bien dans sa composition minérale qu'organique.

2° *Etude des matières organiques du sang.*

Après avoir déterminé en bloc les matières organiques et minérales sous forme d'extrait sec et les éléments minéraux sous forme de cendres, nous avons dosé et noté les variations du chlore, du calcium, du magnésium, du cuivre, du soufre et du phosphore.

Pour les éléments organiques, nos recherches ont porté sur l'azote protéidique, l'azote uréique et l'azote résiduel; l'urée, l'acide urique, le glucose, la glycolyse et enfin sur les protéines, nucléines et glucoprotéides, globulines et sérines.

Avant d'entrer plus avant dans l'exposé de notre travail, nous sommes heureux de remercier spécialement M. le Professeur COUVREUR qui a bien voulu nous guider de ses conseils et nous soutenir de sa sympathie. Nous lui gardons une bien vive reconnaissance d'avoir accepté d'être notre Président de Thèse.

Que notre Maître, M. le Professeur LEULIER trouve ici l'expression de notre vive gratitude. Ses encouragements, la direction et les méthodes de travail qu'il nous a donnés sans compter, ainsi que la cordialité et l'inlassable bonté que nous avons toujours trouvées

en lui depuis plusieurs années, nous ont rendu la tâche bien plus aisée; nous le remercions de tant de bienveillance et profitons de l'occasion pour lui témoigner notre reconnaissance, notre respectueuse affection, et l'assurer de notre profond dévouement.

Nous avons trouvé auprès de M. le Professeur CLUZET un accueil très amical, et il a bien voulu mettre à notre disposition le matériel de son laboratoire; qu'il veuille bien accepter ici notre gratitude.

M. KOFMAN s'est très aimablement mis à notre disposition pour les déterminations physiques; nous l'en remercions bien vivement.

HISTORIQUE

L'escargot, *Helix pomatia* L, est si répandu dans nos régions que son sang a été souvent l'objet d'études spéciales. Nous ne ferons ici qu'un rapide historique, nous réservant, au cours de notre travail, de donner plus d'ampleur aux recherches qui se rapprochent des nôtres, au début des chapitres où nous les exposons.

Dès 1817, ERMAN note la teinte bleue du sang aéré de l'*Helix pomatia* L, et, complétant cette observation par des analyses qualitatives sur le sang des crustacés, y décelait la présence de cuivre, soulevant ainsi le premier la question des sangs hémocyaniques, ainsi appelés plus tard par FRÉDÉRICQ en 1878.

En 1824, CARUS attire également l'attention des physiologistes sur la coloration bleue du sang d'écrevisse. Puis, jusque vers la seconde moitié du XIX^e siècle, l'étude du sang d'escargot est abandonnée, en effet les physiologistes paraissent plus particulièrement séduits par la coagulation des sangs à pigments bleus.

C'est CARUS qui remet à l'ordre du jour ce phénomène qui avait été étudié une première fois dès 1770 par HENSON dans son étude sur la coagulation du sang des crustacés.

En 1843, CARPENTIER établit définitivement la formation de fibrine dans le sang des invertébrés. WARTON JONES, en 1846, étend la question à une étude spéciale de la coagulation du sang du crabe et du homard. Enfin, en 1857, HAECKEL et en 1858 WITTING étudient la fibrine et le fibrinogène. Aucun de ces auteurs ne parle de la coagulation du sang d'escargot. Ce sera seulement vers 1900 que le problème sera étudié par M. le Professeur COUVREUR d'abord et par CAMUS ensuite; tous deux concluent à l'absence totale de la coagulation.

Puis la coloration bleue du sang de certains invertébrés est à nouveau étudiée. Paul BERT, dans ses travaux sur la seiche, prétend que la substance bleuissant à l'air est le véhicule de l'oxygène et cela soulève toute une série de recherches. En 1869, GENTH indique la présence de cuivre dans le sang des Limules. En 1875, RABUTEAU et PAPILLON montrent que le sang décoloré de poulpe et de crabe bleuit au contact de l'air et redevient incolore au contact du gaz carbonique. Enfin, en 1878, FRÉDÉRICQ émet dans sa note sur « *l'hémocyanine, substance nouvelle du sang de poulpe* », que le sang de ce céphalopode contient une seule matière albuminoïde bleue capable de fixer l'oxygène, où le cuivre entre comme élément constitutif. Il la nomme « *Hémocyanine* ». Cette hémocyanine est traitée par l'acide azotique qui précipite les protéines

tandis que le cuivre passe dans la liqueur, comme le fer dans le cas de l'hémoglobine. Cette théorie est admise par KRUKENBERG et HALLIBURTON. FRÉDÉRICQ montre en 1890 que l'hémocyanine résiste à la putréfaction. Mais en 1892, HEIM, dans sa thèse et dans une communication sur la matière colorante bleue du sang des crustacés, émet l'idée que l'hémocyanine n'est pas seule matière albuminoïde de ce sang, que certaines même n'ont pas de cuivre. Il ajoute que contrairement aux théories de FRÉDÉRICQ : l'hémocyanine ne fixe pas plus d'oxygène que l'eau. C'est alors que GUÉNOT, dans sa note sur la valeur respiratoire de l'hémocyanine, démontre que le sang d'*Helix pomatia* peut fixer jusqu'à deux fois et demi plus d'oxygène que l'eau. Ce même auteur avait déjà, en 1890, publié des recherches sur les éléments figurés du sang des invertébrés et les glandes lymphatiques, complétant ainsi les travaux antérieurs de CATTANEO sur l'*Helix*, de LEYDIG sur la paludine, de JOYEUX LAFFUIE sur l'oncidie, WEGMANN sur les haliotes. Il montre que les glandes lymphatiques de l'*Helix*, génératrice des amibocytes, sont les gros vaisseaux des sacs pulmonaires.

En juillet 1892, FRÉDÉRICQ prépare, à partir du sang du poulpe, de l'hémocyanine amorphe par précipitation à l'aide du sulfate de magnésie. Mais GRIFFITHS avait déjà, dans une note à l'Académie des Sciences du mois de février de la même année, établi la formule globale de l'hémocyanine. Puis, deux mois plus tard, il étudie le pigment coloré du « *Pinna squamosa* » détermine la formule de la globuline sanguine

et y démontre la présence du *manganèse*. Il la nomme *pinnaglobuline*.

Ensuite, pendant une dizaine d'années, les travaux sur les sangs hémocyaniques se font rares, mais en 1900, M. COUVREUR montre que le sang d'*Helix pomatia* L est incoagulable, ne contient pas de fibrine, renferme de l'urée, une globuline et une sérine, en quantité moindre. Il note la présence du cuivre dans le même sang. Raphaël DUBOIS ne trouve point de sucre dans le sang de l'escargot en hibernation et dose le cuivre. Charles DHÉRÉ, de son côté, poursuit des recherches analogues et détermine le pouvoir respiratoire de l'hémocyanine en fonction du cuivre. CAMUS admet l'incoagulabilité du sang d'*Helix* et détermine son action anticoagulante *in vitro* et *in vivo*. PHISALIX étudie alors la réduction de l'hémocyanine dans le sang d'escargot. D'après lui, il renfermerait des substances réductrices dont l'action serait entravée par la dialyse, par le chloroforme, l'éther, le formol, le fluorure de sodium, le sulfate de magnésie et favorisée au contraire par l'oxalate de soude.

En 1902, MM. COUVREUR et L. ROUQUIER, dans un travail sur les dérivés de l'hémocyanine, notent la décomposition de cette dernière avec le temps, le sang âgé prenant une coloration brune. Le premier de ces auteurs poursuivant la recherche de sucre réducteur dans le sang d'escargot conclut à son absence totale pendant les différents stades de la vie de l'animal et dose les matières organiques et les cendres. En 1903, Charles DHÉRÉ, dans sa note sur l'action de l'alcool et de la chaleur sur l'hémocyanine, prétend qu'après

dialyse la précipitation n'a plus lieu, même si on ajoute des sels dialysables et conclut à la différence avec l'hémoglobine. Ces réactions ont été contredites par MM. COUVREUR et HENZE. En 1905, Gaston SEILLIÈRE fait une étude sur une diastase, capable d'hydrolyser la xylane, dans le suc gastro-intestinal de l'escargot, en pentoses et hexoses.

Deux mois plus tard, il étend son étude de la xylanase chez différents mollusques. La même année, Maurice PACAUT étudie les propriétés diastasiques de la salive de l'*Helix pomatia* L, où il rencontre un ferment amylolytique. Gaston SEILLIÈRE communique, en 1906, une remarque sur l'hydrolyse diastasique de quelques pentosanes par le suc digestif de l'*Helix pomatia* L. L'année suivante, Mlle Marguerite BELLION étudie la diminution des sucres chez le même animal, pendant la période d'activité dans le foie, la glande de l'albumine et le muscle. M. COUVREUR et Mlle BELLION, en octobre 1907, dans la note sur le sucre du sang d'*Helix pomatia* L, annoncent n'avoir point trouvé de sucre dans les différents états de vie.

SEILLIÈRE publie alors ses recherches sur le sang d'escargots nourris après un jeûne estival avec d'une part de la xylane, d'autre part avec de l'amidon, et conclut : la réaction de Tollens étant positive dans chacun des cas, à la présence de pentoses dans le premier et d'hexoses dans le second.

C'est alors que M. COUVREUR et Mlle BELLION ont essayé de mettre en évidence le sucre dans le sang par la formation de phénylglucosazone. Devant leur insuccès, ils ont admis que la coloration obtenue

dans la réaction de Tollens par M SEILLIÈRE était due à la présence probable de xylane, d'acide glycuronique ou de galactose.

SEILLIÈRE, reprenant alors ses expériences sur des escargots nourris à la mie de pain, parvient, en concentrant le sang, à former des phénylglucosazones. Mais COUVREUR fait remarquer la nécessité d'un régime spécial pour trouver du sucre dans le sang.

Enfin Mlle BELLION, dans sa thèse, en 1909, conclut à l'absence de sucre pendant la vie active, ainsi qu'au début et à la fin de l'hibernation, alors qu'on le trouve à l'état de traces au milieu de cette vie ralentie.

Dès 1908, des études d'ordre physique et tout particulièrement spectroscopique, vont préoccuper les physiologistes et surtout Charles DHÉRE. Dès cette année, cet auteur publie les propriétés de l'hémocyanine cristallisée.

En 1917, en collaboration avec VEGEZZI, il pousse ses recherches sur l'*hélicorubine*. En 1919, BOTTAZZI dirige ses recherches vers la réduction de l'oxyhémocyanine par des procédés physiques et biologiques. Il réduit le sang de l'*Octopus macropus* à l'aide de la trompe à mercure, de la coagulation et de la centrifugation.

D'après lui, les leucocytes provoqueraient la décoloration du sang; lorsqu'ils sont tués par le chloroforme, l'hémocyanine ne se décolore plus, donc ce phénomène serait dû à la présence d'enzymes dans les leucocytes. GUÉNOT, dans une étude sur les sangs hémocyaniques, prétend qu'il y a en général 2 protéines *fibrinogène* et *hémocyanine* et qu'en période de jeûne,

le fibrinogène serait le premier détruit. La même année, DHÉREÉ étudie le spectre d'absorption visible de l'oxyhémocyanine obtenue en partant du sang d'escargot, de seiche, de langouste, de homard et d'écrevisse. Dans tous les cas, en opérant avec du sang, sans traitement préalable, on obtient une bande à peine visible que seuls KRUKENBERG et GAUTRELET avaient aperçue avant lui. En opérant avec une source lumineuse intense sur de l'oxyhémocyanine cristallisée obtenue, soit par dialyse seule, soit à l'aide du courant électrique, soit encore par cristallisation lente d'une solution surnaturée, sans addition, ni soustraction d'électrolytes, soit enfin par cristallisation en présence de sulfate de soude et dissoute dans des solutions alcalines, limpides et riches en pigments, cet auteur a obtenu une bande d'absorption très nette dont l'axe est situé dans le jaune. Les longueurs d'ondes sont comprises entre 571 et 581 μ et les variations proviennent non seulement de la solution alcaline, mais encore de l'origine zoologique du pigment. L'auteur, la même année, étudie, avec SCHNEIDER, l'action des gaz sur les pigments respiratoires, la dissociation de l'oxyhémocyanine, la combinaison de l'hémocyanine avec le bioxyde d'azote, soit l'hémocyanine bioxyazotée isolée sous forme de petits cristaux verts.

DHÉREÉ, en 1920, publie le spectre d'absorption ultraviolet de l'oxyhémocyanine du sang d'escargot filtré et de l'oxyhémocyanine cristallisée de l'octopus vulgaris, de l'écrevisse, etc... En 1922, en collaboration avec SCHNEIDER, il essaye l'action de l'hydrogène, du gaz carbonique et de l'oxyde de carbone sur l'hémocyanine.

Enfin, en 1923, DAMBEAUVICEANU fait l'étude de certains éléments du sang d'escargot au point de vue physique; il détermine également les proportions et qualités des albuminoïdes.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIOLOGIQUE

I

Influence de la température sur la circulation

L'*Helix Pomatia L* s'adapte à des manières de vivre très différentes; par exemple, il supporte des variations de température assez considérables. Il nous a paru intéressant d'étudier la répercussion de ces variations sur le rythme cardiaque.

SPALLANZANI a constaté qu'avec l'abaissement de la température, les mouvements du poumon devenaient plus rares et les battements du cœur moins fréquents. Nous avons compté les contractions du cœur en fonction de la température. Un escargot en hibernation non operculé nous a servi à cet examen. Nous avons cassé la coquille avec précaution, de façon à bien dégager la zone voisine du cœur sans blesser l'animal. Nous l'avons placé sur une petite verre surélevé, dans un cristalliseur contenant de l'eau, pour conserver l'atmosphère humide. Le tout étant recouvert d'une

cloche à vide. L'orifice de la cloche est garni d'un bouchon perforé, par lequel nous avons fait passer un thermomètre, permettant de suivre les modifications de température. Pour éviter toute cause d'erreur, le thermomètre est enfoncé assez profondément dans la cloche, le réservoir étant presque en contact avec le corps de l'escargot.

Ce qui nous a d'abord frappé, c'est l'irrégularité des contractions cardiaques. Elles sont, en effet, moins rythmées à basse température qu'à température élevée et plus nombreuses pendant que l'animal respire. La respiration est elle-même très irrégulière. La température ambiante étant de 16°, nous en avons assuré la diminution progressive en plaçant l'appareil dans une glacière. Peu après avoir cassé la coquille, nous avons compté en une minute 27 contractions. Nous attribuons cette différence, avec les chiffres qui vont suivre, à la préparation de l'animal.

A 15°, nous avons compté 17 contractions par minute. A 14°, 2 mesures successives, nous ont donné 10 contractions; une troisième 11 contractions, avec un arrêt très marqué après la sixième; à 10°, 10 contractions; à 8°, 2 contractions. Nous avons opéré sur 5 mesures différentes et pris la moyenne, tant l'irrégularité est grande. Enfin, à 7°, la circulation est tellement ralentie, que nous pouvons admettre zéro contraction à la minute comme chiffre exact, aucune pulsation n'ayant été enregistrée en 5 minutes.

A partir de ce moment, nous avons laissé l'animal reprendre la température ambiante et nous avons noté : à 10°, 11 contractions; à 14°, 10 contractions; à

15°, 12 contractions. Nous avons ensuite porté le cristallisoir et la cloche contenant l'animal dans une étuve de GAY-LUSSAC dont nous avons élevé progressivement la température. A 17°, les contractions irrégulières, par groupes de 7 ou 8, séparées par des latences de 4 à 5 secondes, sont au nombre de 18, à 22° de 25 contractions, à 24° de 30 contractions, à 26° de 35 contractions, et à 27° de 36 contractions. On voit que le nombre des contractions augmente d'une façon constante avec l'élévation de température.

Sur un deuxième animal préalablement placé à la glacière, préparé comme le premier, nous avons, en élevant progressivement la température, trouvé les chiffres suivants :

11°	10 contractions	
14°	17	—
22°	23	—
22°	28	—
30°	43	—
38°	77	— très régulières.

Enfin, à 39°, l'animal s'est déplacé dans sa coquille. L'ouverture que nous y avons pratiquée est insuffisante pour permettre de voir battre le cœur.

CONCLUSIONS. — *Nous en concluons que la circulation sanguine est en relation directe avec la température et que dès 7° le cœur ne bat plus, alors qu'à 38° le rythme est très accéléré et d'une grande régularité.*

II

Prélèvement du sang

L'Helix pomatia L, animal de petite taille, ne renfermant qu'une très petite quantité de sang, offre au prélèvement de ce liquide certaines difficultés, surtout lorsqu'il s'agit d'en recueillir un volume assez considérable. Pour nos déterminations, nous avons utilisé 3 litres de sang environ.

On pourrait, à la rigueur, ponctionner à l'aide d'une seringue, un point de l'appareil circulatoire, mais c'est compliquer inutilement, semble-t-il, une opération déjà fastidieuse par elle-même. Nous avons eu recours à la saignée à blanc par incision du cœur. Avant de décrire cette technique, nous signalerons cependant les autres procédés qui peuvent être utilisés :

Il y en a trois principaux :

- 1° *Prélèvement dans le pied ;*
- 2° *Prélèvement dans le poumon ;*
- 3° *Prélèvement dans le cœur.*

a) *Prélèvement dans le pied.*

Le sang que l'on peut ainsi récolter n'est pas d'une pureté satisfaisante. En effet, sur la sole pédieuse se trouvent, englobée par du mucus, une foule de substances étrangères, d'origine exogène ou endogène (les poussières du sol et les déjections de l'animal, surtout en période estivale, quand l'escargot défèque dans sa coquille).

De plus, la saignée au pied provoque une sécrétion abondante de mucine qui peut modifier la teneur en matières albuminoïdes et en sucre combiné.

En période d'hibernation, il est à peu près impossible de dégager le pied sans déchirer les tissus de l'animal, tout particulièrement le tube digestif, et par suite, d'entraîner avec le sang, des matières étrangères qui, dans les dosages, sont autant de causes d'erreur.

b) *Prélèvement par section des veines pulmonaires.*

Ce procédé est préférable au précédent. Un sang plus pur est obtenu. Mais il n'est pas sans offrir de grandes difficultés. En général, une seule incision dans les vaisseaux pulmonaires est insuffisante, car l'écoulement est lent et comme la plaie est petite, on ne peut facilement faire une saignée à blanc. La répétition de cette opération serait très délicate, car on aurait ainsi de grands risques de déchirer le foie, qui laisserait écouler des liquides pouvant souiller le sang déjà recueilli.

Ce procédé de saignée est avantageux pour l'étude

des amibocytes du sang. En effet les glandes lymphatiques qui se trouvent, d'après GUÉNOT, sur la surface externe du sac pulmonaire, sont sectionnées en même temps que les veines et on obtient ainsi un sang riche en éléments figurés et jeunes.

c) *Prélèvement dans le cœur.*

C'est le procédé que nous avons choisi. Il présente en effet de grands avantages, tant au point de vue pureté qu'au point de vue quantité; de plus, l'opération est rapide.

Nous commençons par essuyer soigneusement la coquille de chaque escargot. Ce nettoyage est de beaucoup plus simple que celui du pied de l'animal. Puis, avec un petit marteau en fer, nous cassons la coquille à la hauteur présumée du cœur. Avec un peu d'habitude, on arrive à repérer aisément sa position exacte et à le mettre à jour sans blesser l'animal. Le cœur continue à battre régulièrement. Il suffit de sectionner, avec des ciseaux très effilés, le péricarde, puis l'oreillette, en ayant soin de diriger la pointe des ciseaux vers le poumon et non vers le rein, pour éviter de le perforer. Nous retournons ensuite l'animal de façon à maintenir en bas l'ouverture faite dans la coquille. Nous le plaçons dans un petit entonnoir surmontant un tube à essai. Le sang s'écoule lentement. Une légère pression faite sur le corps même de l'escargot, en introduisant l'auriculaire par l'orifice de la coquille, permet d'en extraire les dernières gouttes.

Cette technique donne une quantité relativement grande de sang pur. Il faut éviter de presser trop fort pour ne pas souiller le sang par d'autres liquides physiologiques, provenant des déchirements d'organes. Le sang est immédiatement filtré sur papier Chardin pour que la filtration ne soit pas trop longue.

Le papier Berzelius, ou même le papier filtre ordinaire sont d'une pâte trop serrée.

Nous avons reçu le sang dans des tubes à essai contenant du toluène, pour éviter autant que possible toute altération. Pour les dosages, où la présence de toluène pouvait être nuisible, nous avons utilisé comme antiseptique le fluorure de sodium. Enfin, nous avons opéré, dans certains cas, sans antiseptiques, quand le sang était utilisé immédiatement.

III

Aspect général du sang

Le sang ainsi obtenu, au sortir du cœur, se présente sous forme d'un liquide légèrement bleu. Mais son passage dans l'air, et en particulier à travers le filtre, lui fait prendre une teinte bleue foncée. Si on place un tube contenant de ce sang dans un rayon lumineux intense, il présente, par réflexion, l'aspect d'une émulsion d'un beau bleu. Par transparence, il apparaît au contraire coloré en violet et parfaitement limpide. C'est donc un liquide dichroïque. Si nous recevons le sang filtré dans un tube à essai sans y ajouter d'antiseptique, au bout de 1 h. à 2 heures, le sang se décolore en commençant par la base du tube. Il prend dans presque toute sa hauteur, sauf à la surface de séparation qui reste bleue, une coloration légèrement jaune, ayant à peu près l'aspect du sérum humain. Si on agite le tube, on voit des ondes moirées se former dans le sang, qui se recolore peu à peu en bleu et reprend sa teinte primitive. Si nous laissons le sang en repos, il se décolore à nouveau et, au bout

de plusieurs jours, il devient de plus en plus brun. Par agitation, il redevient bleu, même au bout de plusieurs mois, mais il est devenu trouble par transparence.

Cette expérience confirme celle de FRÉDÉRICQ, faite en tube scellé, et prouve la résistance de l'hémocyanine à la putréfaction.

Si nous recevons le sang filtré dans du toluène, il passe à la partie inférieure du tube. Dans ce cas, la coloration se maintient plusieurs jours, s'affaiblit et disparaît peu à peu. L'aération par agitation lui redonne sa teinte primitive. La présence de cet antiseptique retarde donc beaucoup la décoloration. Au bout de plusieurs jours, le sang devient de plus en plus brun. Le benzène, le chloroforme, le sulfure de carbone, l'éther agissent de même façon que le toluène. Aucun de ces solvants n'entraîne l'hémocyanine. Les alcools méthylique, éthylique et amylique, ainsi que l'acétone, le précipitent en blanc. Le sulfate de magnésie à saturation donne un précipité bleu, qui ne se sépare bien qu'après plusieurs mois de contact. Le sulfate d'ammoniaque donne un précipité également bleu, qui se rassemble au contraire très rapidement à la partie supérieure. Le fluorure de sodium rend le sang plus opalescent.

Le sulfhydrate d'ammoniaque ne donne rien de particulier sur le sang fraîchement prélevé. Sur le sang brun par altération, il donne au contraire une réaction très nette que nous étudierons plus loin. L'eau et la glycérine sont miscibles en toutes proportions.

Les acides minéraux précipitent le sang.

Les prélèvements effectués aux différentes époques de l'année nous ont montré que le sang d'été s'écoule plus rapidement et plus abondamment. On peut obtenir par notre procédé 6 à 7 cmc. en moyenne pour chaque animal adulte.

En période d'hibernation, le sang, plus concentré, plus bleu, est en quantité moindre. On obtient environ, par individu, 3 à 4 cmc.

Nous avons remarqué que les escargots, dont la coquille est fortement colorée, ont un sang plus bleu.

La chaleur décolore le sang, puis le fait coaguler. Enfin la dialyse empêche le sang de se décolorer. Nous avons dialysé un mois du sang en présence de toluène. Après un an de séjour, le sang ne s'est pas décoloré, alors que du sang toluéné, non dialysé, se décolore lentement.

IV

Coagulation spontanée

En 1900, le Professeur COUVREUR, faisant agir sur du sang d'escargot une solution de chlorure de sodium à 15 %, ne remarquait aucune coagulation, fait confirmé par CAMUS. Mais PHISALIX prétendait que, par addition de chlorure de sodium pulvérisé, il se formait un léger précipité floconneux, dû à la présence de fibrinogène. Nous avons repris ces expériences. Le sang ne se coagulant pas, nous avons voulu démontrer l'absence de fibrinogène.

1^{re} EXPERIENCE. — A 10 centimètres cubes de sang fraîchement prélevé, nous avons ajouté, suivant le procédé conseillé par HUGOUNENQ, pour la préparation du fibrinogène, 10 centimètres cubes de solution saturée de chlorure de sodium pur. Nous n'avons obtenu aucun précipité, même après 24 heures.

2^e EXPERIENCE. — Le fibrinogène coagulant à +56°, nous avons placé du sang frais dans une étuve maintenue à cette température. Après 1 heure, le sang ne s'était pas modifié.

Le plaçant ensuite dans un B. M. dont on élevait progressivement la température, nous avons constaté que le sang ne se modifiait pas jusqu'à 62°, qu'à cette température il se décolorait en jaunissant légèrement.

Nous avons noté la présence de bulles de gaz à la partie supérieure du tube (vraisemblablement de l'oxygène). En élevant progressivement la température, nous avons remarqué l'apparition d'un louche uniforme vers 70° avec formation de gelée. Enfin, à 76°, la floculation se produit. Le liquide séparé par filtration des flocons albumineux, ne précipite plus même à l'ébullition.

3^e EXPERIENCE. — Nous basant enfin sur les théories actuelles de la coagulation du sang des mammifères dont les facteurs nécessaires sont : *fibrinogène*, *trombogène*, *trombokinase* et *calcium*, nous avons pensé que le sang pouvait manquer de *plasmase*, pour que l'auto-coagulation se produise dans le cas où il y aurait du fibrinogène. Nous avons ajouté à 5 centimètres cubes de sang d'*Helix pomatia L.*, quelques gouttes de sérum humain non filtré et contenant quelques leucocytes, apportant ainsi la *trombokinase*, facteur leucocytaire, et le *trombogène*, facteur plasmatique. Nous n'avons pas ajouté de calcium, le sang de l'*Helix pomatia L.*, comme nous le verrons plus loin, contenant une forte proportion de Ca. Nous

avons laissé pendant 24 heures, dans un endroit frais, ce sang ainsi préparé et nous n'avons constaté aucune trace de fibrine.

Ces 3 expériences prouvent nettement que le sang ne contient pas de fibrinogène et qu'il est spontanément incoagulable.

Mais, DELEZENNE a montré que le sang d'oiseaux, recueilli dans un vase propre, reste liquide pendant des jours, s'il a été préservé de tout contact avec les lèvres de la plaie. Mais l'addition de trace de suc de tissus produit une coagulation instantanée. Nous avons pensé que le sang d'*Helix pomatia* L pouvait présenter des anomalies analogues. Nous avons alors fait un extrait aqueux de pied d'escargot. Quelques pieds d'escargots sont bien broyés avec du sable de Fontainebleau en présence d'eau. Le tout est filtré sur filtre Chardin. Le filtrat concentré dans une cloche à vide contenant de l'acide sulfurique, est ajouté à du sang d'escargot. Nous n'avons obtenu aucune coagulation du sang.

CONCLUSION. — *Le sang de l'Helix pomatia* L ne renferme pas de fibrinogène.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE PHYSIQUE

Avant d'entreprendre l'exposé des déterminations physiques que nous avons effectuées, rappelons les travaux qui ont été publiés jusqu'à nous. Nous n'avons guère à citer que ceux de DAMBEAUVICÉANU. Cet auteur a opéré sur des escargots en hibernation et sur des escargots qu'il a nourris avec de la salade. Il prétend que les résultats des mesures effectuées sont sensiblement les mêmes. Mais nous avons trouvé certaines différences. Nos recherches ont porté sur du sang d'escargot prélevé d'une part sur des escargots *operculés* pendant l'hiver et, d'autre part, sur des escargots *en vie libre* pendant l'été.

I

Densité

Nous avons utilisé pour cette détermination la méthode dite du flacon. Dans un petit flacon de Regnault, dont le bouchon à émeri est surmonté d'un tube capillaire portant un trait de jauge, nous avons versé de l'eau distillée, bouché le flacon de façon que l'eau monte dans le tube au-dessus du trait de jauge. Nous avons placé le tout dans un cristalliseur contenant de la glace fondante et après 10 minutes d'immersion, nous avons retiré, et soigneusement asséché, le flacon et à l'aide d'un papier filtre, amené le niveau d'eau très exactement au trait de jauge. Pendant ces opérations, il faut éviter toute élévation de température. Nous avons pesé ainsi le flacon plein d'eau distillée. Soit P le poids total, nous avons ensuite pesé le flacon vide, soit P' ce poids $P-P'$ divisé par 0,999871 densité de l'eau à zéro degré donne V_0 volume à 0° du flacon. Nous avons opéré comme précédemment avec le flacon rempli de sang à 0° . Soit p son poids, $p-P'$ donne le poids du sang correspondant au volume déterminé précédemment.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

$$P = 53,178$$

$$P' = \underline{33,143}$$

$$P - P' = 20,035$$

$$Vo = \frac{20,035}{0,999871} = 20,0375$$

$$p - P' = 20,398 \qquad p = 53,541$$

$$D = \frac{20,398}{20,0375} = 1,0179$$

La densité est égale à 1,0179.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Nous nous sommes servis du même flacon.

$$Vo = 20,0375 \qquad p = 53,487 \qquad p - P' = 20,344$$

$$D = \frac{20,344}{20,0375} = 1,0149$$

La densité est égale à 1,0149.

CONCLUSION. — *La densité du sang est donc plus forte pendant la période de vie ralentie. que pendant la durée de la vie active. Cette augmentation correspond à une concentration des principaux constituants comme nous le verrons plus loin.*

— — — — —

II

Tension superficielle

Nous avons utilisé le procédé de GAY-LUSSAC basé sur l'élévation du liquide dans un tube capillaire. L'appareil se compose d'une cuve en verre assez large pour que la quantité de liquide montant dans le tube capillaire ne modifie sensiblement pas le niveau du liquide dans la cuve. Le tube capillaire porte une graduation en millimètres et à son extrémité supérieure, renflée, s'adapte un tube en caoutchouc, terminé par une poire en caoutchouc, portant un orifice de commande pour l'arrivée d'air. Un support maintient le tube verticalement au-dessus du réservoir. On aspire le liquide dans le tube capillaire et on le chasse par pression sur la poire. On recommence plusieurs fois pour bien mouiller le tube. On amène très exactement le zéro de l'échelle en coïncidence avec le bas du ménisque du liquide de la cuve. On aspire alors le liquide et on le laisse redescendre de lui-même. Au bout d'un certain temps, le niveau se stabilise. On note le niveau dans le tube capillaire.

Nous avons comparé l'élévation du sang obtenue à celle de l'eau distillée dans les mêmes conditions de température et de pression. Les tensions superficielles des deux liquides sont entre elles comme les hauteurs d'élévations.

I) MESURE EFFECTUEE SUR LE SANG DE
L'HELIX POMATIA L EN VIE LATENTE.

La température, pendant l'opération était de 16°.

Dans ces conditions, la hauteur h dont s'élève l'eau au-dessus de la surface de séparation est :

$$h = 8,05$$

la hauteur h' équivalente du sang est :

$$h' = 7,70$$

en opérant évidemment avec le même tube capillaire soigneusement lavé après chaque détermination.

$$\text{on a } \frac{h}{h'} = \frac{73 \text{ dynes au cm}^2}{x}$$

$$\text{soit } \frac{8,05}{7,70} = \frac{73}{x}$$

$$x = 69,8 \text{ dynes au centimètre carré.}$$

II) MESURE EFFECTUEE SUR LE SANG DE
L'HELIX POMATIA L EN VIE ACTIVE. — La température, pendant l'opération, était de 27°.

Dans ces conditions, la hauteur h dont s'élève l'eau au-dessus de la surface de séparation est :

$$h = 8,36$$

la hauteur h' équivalente du sang est :

$$h' = 8,10$$

$$\text{on a } \frac{h}{h'} = \frac{73 \text{ dynes au cm}^2}{x}$$

$$\text{soit } \frac{8,36}{8,10} = \frac{73}{x}$$

$x = 70$ dynes par centimètre carré.

CONCLUSION. — *La tension superficielle du sang varie avec l'état de vie de l'animal. Elle est plus élevée en vie active qu'en vie latente, le sang ayant une plus grande densité dans ce second état de vie.*

III

Abaissement du point de congélation

Nous avons déterminé le point des congélations au moyen de l'appareil CLAUDE et BALTHAZARD. La réfrigération était produite par l'évaporation d'éther éthylique. Nous avons rempli aux trois quarts le vase extérieur et réuni le tube d'aspiration à une trompe à eau. L'air arrivait dans le vase après avoir traversé un flacon contenant de l'acide sulfurique. Dans le tube central de l'appareil nous avons versé un peu d'alcool, nous y avons introduit ensuite l'éprouvette cryoscopique contenant 10 centimètres cubes de liquide à étudier. Nous nous sommes servis d'un agitateur en spirale et d'un thermomètre gradué au 1/50 de degré. Après avoir entouré le vase d'un manchon de flanelle, nous avons fait fonctionner la trompe à eau de façon à produire un appel d'air sec. Quand la température du liquide est arrivée au voisinage de zéro degré, nous avons agité. La température a baissé jusqu'aux environs de — 2°. Nous avons alors pro-

jeté un petit fragment de glace à l'intérieur de l'éprouvette cryoscopique. Après agitation, la température s'est stabilisée. Nous avons fait alors la lecture. Une première opération a été effectuée avec de l'eau distillée pour repérer le zéro de l'appareil. La lecture nous a donné comme point de congélation de l'eau $+ 0^{\circ},07$. La correction due au déplacement du zéro est donc $+ 0,07$.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Le point de congélation est $-0^{\circ},44$. L'abaissement cryoscopique est donc $\Delta = 0^{\circ},44 + 0^{\circ},07 = +0^{\circ},51$.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

La lecture faite est $-0^{\circ},34$; l'abaissement cryoscopique $+0^{\circ},41$.

CONCLUSIONS. — *Le sang d'escargot en hibernation plus concentré que celui de l'animal en vie active présente un abaissement cryoscopique plus élevé en hiver qu'en été.*

IV

Concentration ionique

Nous avons effectué cette détermination sur le sang total, la concentration des albumines n'étant pas très différente de celle du sérum humain, nous nous sommes servi à cet effet de l'appareil de KLING et LASSIEUR. Cette mesure consiste en l'évaluation de la différence de potentiel observée entre une lame d'hydrogène plongée dans le liquide à étudier et le liquide lui-même. Cette différence étant liée à la concentration de cette solution en ions hydrogène.

On assimile à une lame d'hydrogène une électrode de platine platinée, c'est-à-dire recouverte de noir de platine. Plongée dans le liquide à étudier et environnée d'une atmosphère d'hydrogène, elle constitue « l'électrode d'hydrogène ».

On ne peut mesurer directement la différence de potentiel entre la lame de platine et la solution. Il faut avoir recours à une électrode auxiliaire. Nous avons opéré avec l'électrode au calomel dite saturée.

Le couplage de l'électrode d'hydrogène et de l'électrode au calomel à l'aide d'une liaison liquide, qui dans nos déterminations était une solution saturée de chlorure de potassium (corps neutre), constitue une pile. On mesure la différence de potentiel aux bornes de cette pile par la *méthode de compensation de Poggendorf* au moyen du potentiomètre. Pour les détails de préparation de l'électrode au calomel et du potentiomètre, nous nous contenterons de renvoyer au Manuel de technique de physico-chimie de LEONOR MICHAELIS, traduit par CHABANIER et LOBO-ONELL.

Il faut d'abord, pour faire les mesures, platiniser l'électrode et la saturer d'hydrogène. Nous nous sommes servis d'une électrode en V de MICHAELIS.

Le noir de platine recouvert d'hydrogène possède les mêmes propriétés électro-motrices que s'il était constitué par de l'hydrogène. On doit d'abord recouvrir l'électrode de noir de platine. Dans un vase, on verse 10 centimètres cubes d'une solution contenant pour 30 gr. d'eau, 1 gr. de chlorure de platine et 0 gr. 007 d'acétate de plomb. Dans ce liquide, on introduit une petite électrode auxiliaire de platine, que l'on relie au pôle positif d'un accumulateur. On décape avec de l'acide sulfurique concentré l'électrode à recouvrir de noir de platine et qui est fixée dans le bouchon en verre du tube en V. On rince soigneusement à l'eau distillée, on met en rapport cette électrode avec le pôle négatif de l'accumulateur, puis on la plonge dans la solution de platine. L'électrode ne tarde pas à se recouvrir de noir de platine; elle

est alors lavée à l'eau distillée, puis traitée par l'acide sulfurique dilué. On la place dans le tube en V rempli d'eau, que l'on renouvelle à plusieurs reprises. On remplace l'eau par le liquide à étudier. On sature d'hydrogène cette électrode. Pour cela, on fait arriver de l'hydrogène par l'extrémité ouverte du tube en V opposée à l'électrode. Ce gaz est obtenu au moyen d'un appareil de KIPP, par l'action de l'acide sulfurique sur du zinc, exempt d'arsenic, en présence d'une petite quantité de sulfate de cuivre. Il est purifié par lavage, d'abord dans du permanganate de potasse à 2 %, puis dans une solution concentrée de sublimé.

On laisse arriver l'hydrogène bulle à bulle, jusqu'à ce que l'électrode ne trempe dans le liquide que par son extrémité. On bouche l'autre extrémité du tube avec un bouchon en verre percé d'un trou qui peut mettre en communication, en l'amenant à coïncider avec un orifice latéral du tube en V, l'intérieur du tube et l'atmosphère. Il faut avoir soin en bouchant de ne pas introduire d'air. On renverse une cinquantaine de fois le tube dans les deux sens, de façon à bien saturer d'hydrogène le noir de platine. Au cours de la manœuvre, la bulle d'hydrogène étant du côté de l'électrode, on établit la communication avec l'atmosphère par l'orifice ménagé à cet usage, pour que la pression à l'intérieur du tube soit égale à la pression atmosphérique. On débouche l'extrémité opposée de l'électrode. On place le tube dans un verre contenant de l'eau, où plonge un thermomètre, permettant de noter la température au

moment de l'expérience. On met en communication le tube en V avec l'électrode de calomel saturé. Pour cela, à l'aide d'un brin de laine saturé de chlorure de potassium, on met en communication le verre où aboutit le tube de l'électrode saturée et le liquide à étudier. A l'aide du potentiomètre, on maintient l'aiguille du galvanomètre au zéro, en opposant, à l'aide d'un rhéostat, le courant fourni par un accumulateur. On fait la lecture au potentiomètre et au thermomètre.

Nous avons fait deux déterminations, sur chaque sang, que nous avons comparées avec une solution étalon, dont la composition est la suivante :

Acide acétique	100 cent. cubes.
Soude normale	50 —
Eau	350 —

Le nombre de millivolts mesure la différence de potentiel entre les curseurs des rhéostats et par suite la différence de potentiel aux bornes de la chaîne : électrode hydrogène-liaison-électrode au calomel.

Le P_H est donné par la formule :

$$P_H = \frac{E - A}{B}$$

Les termes A et B sont fournis par la formule de NERNST ; ils dépendent de la température. Pour les obtenir, il suffit de se reporter à la table.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Détermination de E pour l'étalon	517
Détermination de E 1 ^{re} mesure pour le sang	703

Détermination de E 2^e mesure pour le sang 703

Température : 15°

$$P_H = \frac{703 - 252,5}{57,1} = 7,889$$

SANG DE L'*HELI*X *POMATIA* L EN VIE ACTIVE

Détermination de E pour l'étalon 506—

1^{re} détermination de E pour le sang..... 689

2^e détermination de E pour le sang 691

Moyenne, 690. Température, 27°. 517 — 506 = 11.

$$P_H = \frac{(690 + 11) - 245,8}{59,1} = 7,702$$

CONCLUSIONS :

Malgré la différence très importante du poids des cendres par litre de sang de l'animal en vie latente hibernale et en activité, nous obtenons pour le P_H des résultats voisins.

V

Conductivité électrique

Nous avons déterminé la résistance électrique du sang au moyen du pont de KOHLRAUSCH. Nous avons utilisé l'appareil dont le schéma est rapporté ci-contre. A est un accumulateur à circuit sur le primaire d'une bobine I, sur le même circuit, on dispose un petit rhéostat et un interrupteur. On règle la résistance du rhéostat, de telle sorte que le courant ait juste l'intensité nécessaire pour maintenir en mouvement le marteau de l'indicateur. Les pôles du secondaire sont en connexion, comme il est indiqué sur la figure, avec un rhéostat dont la résistance va de 1 à 100 *ohms*. En W est disposé le liquide dont on veut mesurer la résistance. Il est placé dans une cuve d'ARRHÉNIUS. Entre *a* et *b* est tendu un fil mince au-dessus d'une règle graduée. *d* est un contact mobile ; en T est intercalé un téléphone. Quand les résistances *a*, *d*, et *d*, *b*, sont entre elles comme les résistances R et W, il n'existe pas de différence de potentiel entre

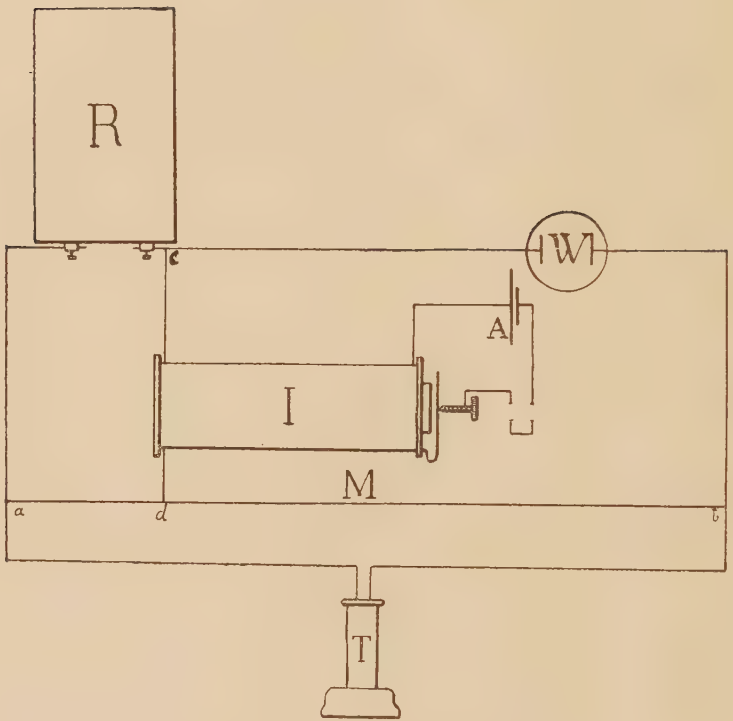


Schéma de l'appareil utilisé pour la mesure
de la résistance électrique du sang.

les points *a* et *b* et le téléphone cesse de résonner. La mesure de la résistance *W* revient donc à déterminer la position du contact mobile pour laquelle le téléphone résonne au minimum et à multiplier la résistance interposée par ce coefficient.

Nous avons vérifié chaque mesure en interposant 10 *ohms* et 100 *ohms*. Nous avons comparé à chaque opération le résultat obtenu à la résistance d'une solution normale de chlorure de potassium, c'est-à-dire contenant 74 gr. 555 de chlorure de potassium chimiquement pur par litre, diluée au 1/50. La conductivité électrique est donnée par la formule

$$K = \frac{C}{X}$$

C étant la constante de capacité de la cellule et *X* étant la résistance de la solution examinée en *ohms*.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

La température à laquelle nous avons opéré est de 16°.

Mesure de la résistance du sang

Première mesure. — En interposant une résistance de 10 *ohms*, $x = 5,3$.

Deuxième mesure de contrôle, en interposant une résistance de 100 *ohms*, $x = 0,53$. $R = 53$ *ohms*.

Détermination de la constante de capacité C de la cellule

Résistance de la solution normale au 1/50 de chlorure de potassium, $R = 17$ *ohms*, la constante de capacité de la cellule est, d'après la table :

$$0,002294 \times 17 = 0,038998.$$

*Conductivité du sang d'Helix pomatia L
en hibernation*

$$K = \frac{0,038998}{53} = 0,000736, \text{ soit } K = 736 \times 10^{-6}.$$

SANG DE L'HELIX POMATIA L EN VIE ACTIVE

Nous avons opéré à 20°.

Mesure de la résistance du sang

Première mesure, en interposant une résistance de 10 ohms, $x = 3$.

Deuxième mesure, en interposant une résistance de 100 ohms, $x = 0,3$.

En définitif, $R = 30 \text{ ohms}$.

*Détermination de la constante de capacité C
de la cellule*

Résistance de la solution normale de chlorure de potassium au 1/50, $R = 16 \text{ ohms}$, $C = 0,002501 \times 16 = 0,040016$.

*Conductivité du sang de l'Helix pomatia L
en vie active*

$$K = \frac{0,040016}{30} = 0,0013339, \text{ soit } K = 133 \times 10^{-5}$$

CONCLUSIONS. — *La conductivité du sang de l'Helix pomatia L en hibernation est moindre que celle du sang de l'escargot en vie active. On pourrait s'attendre à un tout autre résultat, étant donné que le sang d'hiver contient par litre plus de cendres et par conséquent plus d'éléments conducteurs.*

Mais il contient également une proportion de matières albuminoïdes beaucoup plus élevée, dont les molécules s'opposent au passage du courant électrique.

VI

Viscosité

Nous avons déterminé la viscosité du sang au moyen de l'appareil de Hesse, dont nous avons vérifié le bon fonctionnement en faisant d'abord un essai avec de l'eau distillée.

VISCOSITE DU SANG DE *L'HELIX POMATIA* L' EN HIBERNATION. — La viscosité du sang est égale à 1,5.

VISCOSITE DU SANG DE *L'HELIX POMATIA* L EN VIE ACTIVE. — La viscosité du sang est égale à 1,2.

CONCLUSION. — *A la concentration moindre du sang d'été correspond donc, comme il fallait s'y attendre, une viscosité plus faible.*

Action des rayons ultra-violets.

Nous avons examiné l'action des R. U. V. par réflexion. Le sang ne présente aucune fluorescence.

Examen spectroscopique.

Nous n'avons pas abordé cette étude, qui a été faite très minutieusement en 1919 par Charles DHÉRE dans son travail sur l'absorption visible de l'oxyhémocyanine et complétée par la note du même auteur sur « le spectre ultra-violet de l'hémocyanine ».

Nous nous contenterons de renvoyer à ces publications.

TROISIEME PARTIE

ÉTUDE CHIMIQUE DU SANG

A. — Réaction du sang

Nous avons opéré aussitôt après la saignée sur 2 centimètres cubes de sang pur étendus à 8 centimètres cubes, que nous avons répartis en quatre tubes à essai.

Dans le premier, nous avons ajouté une goutte de solution aqueuse d'*alizarine sulfonate de soude*. Une belle coloration rouge est apparue ; ce sang est donc alcalin.

Dans le second, V gouttes de *teinture de tournesol* nous ont donné une coloration bleue.

Dans le troisième, II gouttes de *teinture de cochenille* ont produit une coloration violette.

Dans la quatrième, I goutte de *phénolphtaléine* a donné la coloration rose. Le sang est donc alcalin pour chacun des réactifs précédents.

B. — Détermination de l'extrait sec

Dans une capsule de platine tarée, on mesure, avec une pipette exactement graduée, 10 centimètres cubes de sang ; puis on porte à l'étuve à 100° et on laisse refroidir dans un exsiccateur à acide sulfurique. On pèse. On reporte à l'étuve jusqu'à ce que deux pesées successives ne donnent aucune variation de poids.

On obtient ainsi par différence l'extrait sec pour 10 centimètres cubes. Il suffit de multiplier par 100 pour avoir l'extrait au litre.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Poids de la capsule de platine 38 gr. 7054

Poids de la capsule avec l'extrait sec

de 10 cent. cubes de sang 39 gr. 154

Poids de l'extrait sec par litre :

$$(39,154 - 38,7054) \times 100 = 44 \text{ gr. } 860.$$

Nous avons adopté ce résultat comme se rapprochant le plus de la moyenne de trois déterminations.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Poids de la capsule de platine tarée.. 43 gr. 366

Poids de la capsule avec l'extrait de

10 cent. cubes 43 gr. 6157

Poids de l'extrait sec par litre :

$$(43,6157 - 43,366) \times 100 = 24 \text{ gr. } 97.$$

CONCLUSION. — *Le sang d'escargot présente, en hiver, une concentration qui est presque double de celle du sang d'été.*

C. — Dosage des cendres

Dans un creuset de platine taré, on mesure 10 centimètres cubes de sang, on ajoute 0 gr. 50 de nitrate d'ammoniaque. On évapore à siccité au bain-marie, puis on place la capsule sur un brûleur Bunsen ; la substance noircit et s'enflamme. Le nitrate d'ammoniaque facilite la combustion, son addition dans le sang même a pour but de le répartir parfaitement dans l'extrait sec formé. On chauffe au rouge sombre, sans dépasser cette température, pour éviter la volatilisation des chlorures. On obtient ainsi des cendres blanches. On pèse le creuset, après refroidissement, dans un exsiccateur à acide sulfurique. Par différence, on a le poids des cendres de 10 centimètres cubes de sang. Pour avoir les cendres par litre, il suffit de multiplier par 100.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Poids du creuset avec cendres	38 gr. 7834
Poids du creuset de platine	38 gr. 7054
Poids des cendres de 10 cent. cubes.....	0 gr. 0780
Poids des cendres par litre	7 gr. 80

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Poids du creuset de platine vide	43 gr. 366
Poids du creuset contenant les cendres	
de 10 cent. cubes	43 gr. 4155
Poids des cendres de 10 cent. cubes.....	0 gr. 0495
Poids des cendres par litre	4 gr. 95

CONCLUSION. — Comme pour l'extrait *séc*, le sang d'hiver renferme sensiblement un poids de cendres double de celui du sang d'été. En se basant sur ces deux déterminations, le sang d'hiver semble donc subir surtout une simple déshydratation.

ÉLÉMENTS MINÉRAUX DU SANG

I

Détermination qualitative des éléments minéraux du sang

Nous avons fait cette étude à l'aide de l'analyse spectrale et de l'analyse chimique.

ANALYSE SPECTRALE DES CENDRES DU SANG

Cet examen a été fait au moyen du spectroscope de KIRCHOFF et BUNSEN. Le micromètre était éclairé par un bec de gaz Auer. La lumière monochromatique qui nous a permis d'orienter était fournie par du chlorure de sodium fondu placé dans une nacelle de platine au-dessus d'un bec Bunsen devant la fenêtre du collimateur. Après réglage de la fente, nous avons amené la raie du sodium à la division 50 du micromètre. Le nettoyage du fil de platine qui nous a servi au cours de l'opération, et la vérification de sa pureté absolue s'imposait. Le nettoyage a été effectué

par l'acide chlorhydrique et essai à la flamme jusqu'à absence de raies dans le spectre. Nous avons vérifié également l'acide chlorhydrique et l'azotate d'ammoniaque, qui nous ont servi pour cette analyse. Pour cela, nous avons utilisé environ 1 gr. d'azotate pur et 1 centimètre cube d'acide chlorhydrique pur et nous avons fait l'essai à la flamme. Nous n'avons obtenu aucune raie dans le spectre, donc ces corps sont d'une pureté absolue, tout au moins au point de vue spectroscopique. Après cette vérification, nous avons calciné en présence d'azotate d'ammoniaque 20 centimètres cubes de sang, suivant la technique employée pour l'obtention des cendres. Le résidu fixe ainsi obtenu a été traité par l'acide chlorhydrique, pour le transformer, autant que possible, en chlorures plus volatils. A l'aide du fil de platine, nous avons porté de petites parcelles dans la flamme du Bunsen, placé devant le collimateur. Il y a eu apparition de nombreuses raies colorées dans le champ de la lunette.

1° Une double raie rouge intense à la division 17;

2° Une raie rouge intense, mais fugace, à la division 32;

3° Une raie double jaune orangé, peu nette, à la division 45 ;

4° Deux raies très voisines, d'un jaune intense, à la division 50 ;

5° Une raie verte très peu visible, à la division 54 ;

6° Une raie violette très peu visible à la division 155.

Les deux raies de la division 17 et celle de la division 155 sont celles du « *potassium* ».

La raie 32 est celle du *lithium*, mais très fugace.

La raie double 45 et la raie 54 sont celles du *calcium*.

La raie double de la division 50 est celle du *sodium*.

CONCLUSION. — *L'analyse spectrale des cendres permet d'établir la présence de sodium, potassium, calcium et trace de lithium dans les cendres du sang.*

DÉTERMINATION DE LA PRÉSENCE D'AUTRES ÉLÉMENTS
DANS LES CENDRES DU SANG PAR LES MÉTHODES CHIMIQUES

Recherche du chlore.

Quelques centigrammes de cendres obtenues par calcination avec de l'azotate d'ammoniaque sont solubilisés dans l'acide azotique étendu. Un centimètre cube de cette solution, traité par la solution d'azotate d'argent, donne un précipité blanc abondant et cailleboté très soluble dans l'ammoniaque.

Deux centimètres cubes de la solution azotique des cendres sont traités par un centimètre cube de solution saturée de permanganate de potasse, et un centimètre cube d'acide sulfurique. On chauffe légèrement, il se dégage des vapeurs de chlore à odeur caractéristique et qui colorent en violet une baguette de verre trempée au préalable dans le réactif de

Villiers et placée au-dessus du tube. Réaction colorée caractéristique du chlore.

Le sang d'escargot renferme donc des chlorures.

Recherches du soufre et du phosphore.

Dix centimètres cubes de sang sont calcinés avec de l'azotate d'ammoniaque vérifié, exempt d'acides sulfurique et phosphorique.

Les cendres ainsi obtenues sont solubilisées par de l'acide azotique pur et étendu, puis la solution est répartie en deux tubes.

Dans le premier, on ajoute, après neutralisation par l'ammoniaque, de l'azotate de baryum ; on obtient un précipité blanc, lourd, insoluble dans l'acide chlorhydrique, caractéristique de l'acide sulfurique. Le soufre organique qui pouvait accompagner le soufre minéral a été en effet transformé en sulfates par la calcination en présence de l'azotate d'ammoniaque. *Nous concluons à la présence de soufre dans le sang.*

Dans le deuxième tube, on ajoute un excès d'acide azotique et quelques gouttes de réactif nitromolybdique ; il se forme, au bout d'un certain temps, un léger précipité jaune de phosphomolybdate d'ammoniaque, caractéristique de l'acide phosphorique. Le phosphore organique (phosphatides), par calcination en présence d'azotate d'ammonium, a été oxydé et transformé en phosphates. *Nous concluons à la présence de phosphore dans le sang.*

II

Déterminations quantitatives des éléments minéraux du sang

A. — Chlore

Le chlore existe dans le sang à l'état de chlorure; nous l'avons dosé de la façon suivante :

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 200 centimètres cubes, on mesure 5 centimètres cubes de sang. On ajoute 10 centimètres cubes d'une solution décimorale d'azotate d'argent à 17 gr. par litre, 10 centimètres cubes d'une solution saturée de permanagaté de potasse et 15 centimètres cubes d'acide azotique pur. On bouche la fiole avec un bouchon, surmonté d'un tube de verre de 40 centimètres, qui servira de réfrigérant. On porte à l'ébullition. On la maintient une demi-heure environ, et après la destruction complète de la matière organique, on verse le tout dans un flacon jaugé de 100 centimètres cubes. On entraîne avec de l'eau distillée le précipité qui s'est formé. On lave soigneusement la fiole d'Erlenmeyer et les eaux de lavage sont versées dans le

flacon jaugé. On complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. On bouche. On agite et on filtre 50 centimètres cubes de liquide.

On ajoute aux 50 centimètres cubes de filtrat correspondant à 2 cmc. 5 de sang, 5 centimètres cubes d'une solution saturée d'alun de fer, puis, à l'aide d'une burette graduée, on fait tomber dans le liquide de la solution décime de sulfocyanate de potasse à 9 gr. 70 par litre, jusqu'à virage au rouge persistant. Cette dernière solution doit correspondre exactement à la solution décinormale d'azotate d'argent. Le nombre de centimètres cubes de solution de sulfocyanate de potasse nécessaire pour obtenir le virage est égal au nombre de centimètres cubes de solution d'azotate d'argent, qui n'ont pas été utilisés pour précipiter les chlorures. Ce nombre retranché de 5 et multiplié par 2, puisque l'on n'a opéré que sur 50 centimètres cubes de filtrat, donne la quantité de solution d'azotate d'argent nécessaire pour précipiter tous les chlorures de 5 centimètres cubes de sang. Pour avoir la quantité de chlore, il faut multiplier par 0,0355, et pour rapporter au litre, multiplier ce résultat par 200.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Azotate d'argent N/10 précipité sous forme de chlorure d'argent.:

$$\text{AgCl} = (5 - 2,5) \times 2 = 5.$$

Soit $5 \times 0,00355 = 0$ gr. 01775 de chlore pour 5 cmc.,
par litre, $0,01775 \times 200 = 3$ gr. 550,
et 45 gr. 511 pour 100 gr. de cendres.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Azotate d'argent N/10 précipité sous forme de AgCl :

$$(5 - 3,4) \times 2 = 3,2.$$

soit, $3,2 \times 0,00355 = 0$ gr. 01136 de chlore pour 5 centimètres cubes,

et par litre, $0,001136 \times 200 = 2$ gr. 272,

et 45 gr. 894 pour 100 gr. de cendres.

CONCLUSION. — *Le taux des chlorures par litre est plus élevé dans le sang d'hiver, et cela dans la proportion de 1,56.*

B. — Calcium et magnésium

La coquille, organe de protection de l'*Helix pomatia L*, enroulée autour de la columelle, augmente par sa croissance le nombre de spires. Elle est sécrétée par le bord intérieur du manteau et est constituée par du carbonate de chaux et de la conchyaline. D'autre part, d'après CUVIER, l'opercule fourni par le bourrelet externe du collier a la même composition que la coquille ; le développement de la première et la formation du second doivent amener dans le sang des variations de la teneur en éléments minéraux. Les dosages du calcium et du magnésium deviennent d'un intérêt particulier.

Dosage du calcium et du magnésium.

Les solutions nécessaires pour ces déterminations sont les suivantes :

1° *Une solution décinormale de permanganate de potassium ;*

2° *Une solution au 1/10 d'acide sulfurique ne décolorant pas le permanganate ;*

3° *Une solution à 5 % d'oxalate d'ammoniaque ;*

4° *Une solution à 20 % de chlorhydrate d'ammoniaque ;*

5° *Une solution de phosphate de soude à 10 %.*

1. — Dosage du calcium.

Vingt centimètres cubes de sang sont additionnés de 1 gr. d'azotate d'ammoniaque, évaporés à siccité et calcinés dans une capsule de platine. Aux cendres formées, on ajoute 25 centimètres cubes d'eau distillée, puis 5 centimètres cubes d'ammoniaque et 20 centimètres cubes de chlorhydrate d'ammoniaque à 20 %. Il se forme un léger louche que l'on dissout dans un faible excès d'acide acétique. On verse le tout dans une fiole conique ; on lave la capsule avec de l'eau distillée que l'on verse également dans la fiole conique. On porte à l'ébullition et on ajoute un léger excès de solution d'oxalate d'ammoniaque à 5 %, sans interrompre l'ébullition. On vérifie la présence d'un excès d'oxalate d'ammoniaque de la façon suivante : on arrête l'ébullition, on laisse le précipité se déposer ; une goutte du liquide clair surnageant doit donner, en pré-

sence d'une solution de chlorure de calcium placée dans un verre de montre, un précipité blanc. On laisse déposer pendant 24 heures. L'oxalate de chaux précipité est recueilli sur un filtre suédois sans pli, lavé à l'eau bouillante pour entraîner tout l'excès d'oxalate d'ammoniaque, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne précipite plus par la solution de chlorure de calcium. On perce alors le filtre et on entraîne le précipité dans une capsule de porcelaine à l'aide de 20 centimètres cubes d'eau distillée que l'on envoie en jet violent en soufflant dans la pipette. Le reste du précipité est entraîné par 20 centimètres cubes d'acide sulfurique au 1/10, ne décolorant pas le permanganate de potasse.

Une solution décimale de permanganate de potasse est placée dans une burette. On dose l'acide oxalique de l'oxalate de chaux déplacée par l'acide sulfurique ajouté en dernier, en faisant tomber dans la solution de la capsule chauffée vers 60° le permanganate. Soit n , le nombre de centimètres cubes de solution de permanganate de potasse, $N/10$, nécessaire pour amener dans la capsule une coloration rose persistante :

$n \times 0,002$ donne la quantité de chaux pour 20 centimètres cubes ; pour avoir la quantité au litre, il faut multiplier le résultat par 50. La quantité de calcium par litre est obtenue en multipliant le poids de chaux par 0,7142.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Sang prélevé le 5 janvier.

Premier dosage. .	$n = 4,5$	} moyenne $n = 4,4$
Deuxième dosage	$n = 4,3$	

Poids de la chaux pour 20 cmc. : $4,4 \times 0,002 = 0,0088$.

Poids de la chaux par litre : $0,0088 \times 50 = 0,440$.

Poids de calcium par litre : $0,440 \times 0,7142 = 0,314,248$.

Poids de CaO pour 100 gr. de cendres : 5 gr. 64.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Nous avons opéré, vu la faible teneur en cendres du sang, sur 50 centimètres cubes.

Premier dosage. .	$n = 7,8$	} moyenne $n = 7,9$
Deuxième dosage	$n = 8,1$	

Poids de chaux pour 50 cmc. : $7,9 \times 0,002 = 0,0158$.

Poids de chaux par litre : $0,0158 \times 20 = 0,316$.

Poids de calcium par litre : $0,316 \times 0,7142 = 0,2256$.

Poids de CaO pour 100 gr. de cendres : 6 gr. 585.

CONCLUSION. — *Le sang contient par litre moins le calcium en été qu'en hiver, mais, par rapport à 100 gr. de cendres, le taux est plus élevé.*

Dosage du magnésium.

Le liquide filtré de l'opération précédente, débarrassé de la chaux et additionné des eaux de lavage du filtre, est concentré à 100 centimètre cubes. Il est additionné d'ammoniaque et d'un léger excès de solution de phosphate de soude à 10 %. On laisse

déposer pendant 12 heures. Le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien est recueilli sur un filtre suédois sans cendres. On lave le précipité à l'ammoniaque étendue d'eau, puis on dessèche et calcine, dans un creuset de platine taré, le filtre et le précipité. Le précipité est transformé en pyrophosphate de magnésie, dont le poids multiplié par 0,3604 donne le poids de magnésie de 20 centimètres cubes de sang.

Pour avoir la quantité de magnésie par litre, il faut multiplier le résultat par 50. La teneur en magnésie multipliée par 0,6 donne le poids de magnésium.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Premier dosage : poids du pyrophosphate de magnésie de 20 cent. cubes : 0 gr. 0314.

Deuxième dosage : 0,0308.

Poids moyen de pyrophosphate de magnésie pour 20 cmc. de sang : 0 gr. 0311.

Poids de magnésie de 20 centimètres cubes de sang :
 $0,0311 \times 0,3604 = 0,01120844.$

Poids de magnésie par litre :
 $0,01120844 \times 50 = 0 \text{ gr. } 550422.$

Poids de magnésium par litre :
 $0,550422 \times 0,6 = 0 \text{ gr. } 3302532.$

Poids de MgO pour 100 gr. de cendres : 7 gr. 051.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Nous avons opéré sur 50 centimètres cubes de sang. Premier dosage. Poids de pyrophosphate de magnésie : 0,0572.

Deuxième dosage : 0,0536.

Poids moyen du pyrophosphate de magnésie pour
50 centim. cubes de sang : 0,0544.

Poids de magnésie pour 50 centimètres cubes :

$$0,0544 \times 0,3604 = 0,01996616$$

Poids de magnésie par litre :

$$0,01996616 \times 20 = 0 \text{ gr. } 3993232$$

Poids de magnésium p. lit. : $0,3993 \times 0,6 = 0 \text{ gr. } 23958$.

Poids de MgO pour 100 gr. de cendres : 8 gr. 060.

CONCLUSION, — *Comme pour le calcium, le sang a moins de magnésie par litre en été qu'en hiver, mais le taux est plus élevé pour 100 gr. de cendres.*

C. — Phosphore

Le phosphore existe dans le sang sous deux formes : le phosphore minéral et le phosphore organique. Nous nous sommes servis pour ses dosages de la méthode céruléomolybdique de DENIGES. La méthode céruléomolybdique repose sur la formation d'un composé phospho conjugué de molybdène, dont la couleur bleue intense permet de déceler jusqu'à dix millièmes de milligramme d'acide phosphorique libre ou salifié contenu dans une prise d'essai de 5 centimètres cubes, et de doser par colorimétrie exactement et avec une grande rapidité les moindres traces de phosphore, amené sous forme phosphorique, dans les circonstances les plus variées et notamment dans tous les produits biologiques.

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

a) *Réactif sulfo-molybdique* : Mélanger à volumes égaux une solution aqueuse de molybdate d'ammonium à 10 % et d'acide sulfurique pur.

b) *Solution de chlorure stanneux* : Mettre dans un tube à essai 0 gr. 10 d'étain en feuilles minces, puis ajouter 2 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur et une goutte de solution à 3,5 % de sulfate de cuivre, maintenir à une très douce chaleur jusqu'à dissolution, étendre à 10 centimètres cubes avec de l'eau, laisser refroidir.

c) *Solution à 1 milligramme de phosphore par litre* : Prendre 1 centimètre cube d'une solution contenant 1 gr. 690 de biphosphate d'ammoniaque pur par litre et compléter à 1.000 centimètres cubes.

Dosage du phosphore total.

Il est nécessaire de détruire la matière organique. On mesure un centimètre cube de sang. On le met dans une capsule de porcelaine à fond rond, d'environ 8 centimètres de diamètre. On ajoute un centimètre cube d'acide azotique et un centimètre cube d'acide sulfurique pur, puis, goutte à goutte, trente gouttes d'alcool à 95°. Une vive effervescence se déclare. Quand elle a cessé, on place sur la capsule un petit entonnoir de verre entrant dans la capsule qui le débordera d'environ un centimètre, puis on chauffe doucement sur toile d'amiante. Quand les vapeurs nitreuses ont disparu et sont remplacées par des vapeurs blanches d'acide sulfurique, on retire le feu. On fait tomber goutte à goutte au centre du mé-

lance une dizaine de gouttes d'acide azotique, puis on recommence à chauffer. On oxyde à nouveau avec l'acide nitrique, en continuant ce cycle d'opérations jusqu'à décoloration finale de la masse. Ce point atteint, on continue à chauffer jusqu'à émission importante de vapeurs blanches. On laisse refroidir. On ajoute de 10 à 12 centimètres cubes d'eau et par une ébullition suffisante on réduit le volume à moitié. On complète à 100 centimètres cubes. A 5 centimètres cubes de ce liquide, on ajoute IV gouttes de réactif sulfomolybdique et, après agitation, III gouttes de chlorure stanneux récent. On agite et on examine au bout de 10 minutes, au colorimètre de DUBOSCO, la teinte obtenue comparativement avec 5 centimètres cubes de la solution à 1 milligramme de P^2O^5 par litre traitée, dans les mêmes conditions, par les réactifs sulfomolybdique et stanneux. La dose de P^2O^5 par litre de la solution au 1/1.000 de sang est égale à :

$$x = \frac{h \times 0,001}{h'}$$

h étant la division de l'étalon,

h' celle du tube contenant la solution à doser. Il suffira de multiplier le résultat par 1.000 pour avoir la quantité de P^2O^5 par litre de sang et le poids de P^2O^5 obtenu par 0,4366 pour avoir le poids de phosphore par litre de sang.

Dosage du phosphore minéral.

On mesure très exactement 3 centimètres cubes de sang, que l'on verse dans un tube à essai. On ajoute

3 centimètres cubes d'acide trichloracétique au tiers. On agite. On jette le tout sur un filtre. On prend 2 centimètres cubes de filtrat, qui correspondent à 1 centimètre cube de sang, on étend à 50 centimètres cubes.

On prend 5 centimètres cubes de solution, on ajoute IV gouttes de réactif sulfomolybdique, et, après agitation, III gouttes de chlorure stanneux. On agite et compare à une solution étalon préparée comme pour le dosage du phosphore total. La teneur en P^2O^5 de la solution au 1/50 de sang est égale à :

$$y = \frac{h \times 0,001}{h'}$$

h étant la division du tube,

h' celle de la solution.

En multipliant par 500, on a la teneur en P^2O^5 d'origine minérale par litre de sang. Le poids de P^2O^5 multiplié par 0,4366 donne le poids de phosphore minéral par litre.

Dosage du phosphore organique.

Le phosphore organique est obtenu par la différence entre le phosphore total et le phosphore minéral.

1. — *Phosphore total.*

1) SANG DE L'*HELI*X *POMATIA* L EN HIBERNATION.

$$h = 5 \qquad h' = 19$$

$$P^2O^5 \text{ par litre } \frac{5 \times 0,001}{19} \times 100 = 0 \text{ gr. } 026$$

Phosphore p. litre. = $0,026 \times 0,4366 = 0,11$ mgr. 3516.

Poids de P^2O^5 pour 100 gr. de cendres = 0 gr. 333.

2) SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE.

$$h = 5 \quad h' = 12$$

$$P^2O^5 \text{ par litre} = \frac{5 \times 0,001}{12} \times 100 = 0 \text{ gr. } 041$$

Phosphore par litre = $0,041 \times 0,4366 = 0,17$ mgr. 9.

Poids de P^2O^5 pour 100 gr. de cendres = 0 gr. 828.

2. — **Phosphore minéral.**

1) SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE.

$$h = 5 \quad h' = 16$$

$$P^2O^5 \text{ par litre} = \frac{5 \times 0,001}{16} \times 50 = 0 \text{ gr. } 0157$$

Phosphore par litre = $0,0157 \times 0,4366 = 0,0068$ mgr. 85.

2) SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE.

$$h = 10 \quad h' = 14,5$$

$$P^2O^5 \text{ par litre} = \frac{10 \times 0,001}{14,5} \times 50 = 0 \text{ gr. } 034$$

Phosphore par litre : $0,034 \times 0,4366 = 0,0148$ mgr. 844.

3. — **Phosphore organique.**

Nous avons obtenu le phosphore organique par différence entre le phosphore minéral et le phosphore total.

1) SANG D'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION.

P^2O^5 par litre=0 gr. 026—0 gr. 015=0 gr. 011.

Phosph. par lit.=11 mgr. 35—6 mgr. 85=4 mgr. 50.

2) SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE.

P^2O^5 par litre=0 gr. 041—0 gr. 034=0 gr. 007.

Phosph. par lit.=17 mgr. 9—14 mgr. 8=3 mgr. 1.

CONCLUSIONS. — *Le phosphore lipoïdique semble rester constant, alors que le phosphore minéral est plus abondant pendant la période d'activité.*

D. — Soufre

Le soufre peut exister dans le sang sous deux formes : le soufre organique et le soufre minéral ou soufre des sulfates. Nous avons déterminé d'abord le soufre total, puis le soufre soluble nous avons obtenu le soufre organique par différence.

Pour effectuer ces différents dosages, nous avons été conduits à détruire la matière organique, pour transformer le soufre organique en soufre minéral soluble par oxydation.

Nous l'avons transformé en sulfate précipitable par le chlorure de baryum en milieu chlorhydrique. La destruction de la matière organique et l'oxydation du soufre en sulfates se fait simultanément.

Nous avons utilisé pour cette opération le procédé

tout récent du Professeur LEULIER, publié dans le *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, en mars 1925. Ce procédé présente l'avantage d'être très rapide.

Dosage du soufre total.

MODE OPÉRATOIRE. — Dans un Erlenmeyer de 125 centimètres cubes, on mesure très exactement 5 centimètres cubes de sang, auxquels on ajoute 2 cmc. 5 de perhydrol, et 5 cmc. d'acide azotique. On chauffe légèrement sur toile d'amiante, et avec précautions, après avoir laissé en contact pendant 24 heures, afin d'éviter la formation abondante de mousse. Au bout de 5 à 10 minutes de chauffage, ajouter à nouveau 2 cmc. 5 de perhydrol et continuer un chauffage modéré. Au bout d'une demi-heure, l'opération est terminée. Nous n'avons pas à proprement parler fait une destruction complète de la matière organique; nous l'avons simplement solubilisée mais le soufre, en particulier, solubilisé lui-même, a été également, au cours de l'opération, transformé en ions SO_3 , c'est-à-dire sous forme précipitable par le chlorure de baryum.

On ajoute alors un excès de solution de chlorure de baryum, en solution au 1/10. On laisse au repos pendant 12 heures. On recueille alors le précipité sur un filtre sans cendres, on termine par le dosage pondéral du sulfate de baryte formé comme il est indiqué dans le précis d'analyse chimique de DENIGÈS, au chapitre intitulé : *Dosage de l'acide sulfurique et des sulfates*.

Le chiffre trouvé, multiplié par 200 et par 0,13734, donne le poids de soufre total par litre de sang.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Poids de la capsule vide : 38,7054.

Poids de la capsule avec cendres : 38,7102.

Poids du SO^4Ba correspondant à 5 centimètres cubes de sang : 0,0048.

Poids de SO^4Ba par litre : $0,0048 \times 200$.

Poids du soufre par litre :

$$0,0048 \times 200 \times 0,13734 = 0,1318.$$

Poids de SO^4 par litre : 0,3954.

Poids de SO^4 pour 100 gr. de cendres : 5 gr. 064.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Nous avons opéré sur 25 centimètres cubes de sang, au lieu de 5 centimètres cubes :

Poids de la capsule vide : 38 gr. 704.

Poids de la capsule avec SO^4Ba = 38 gr. 726.

Poids de SO^4Ba pour 25 cmc. de sang : 0,022.

Poids de SO^4Ba par litre : $0,022 \times 40 = 0$ gr. 88.

Poids du soufre par litre : $0,88 \times 0,13734 = 0$ gr. 1208.

Poids de SO^4 par litre : 0 gr. 3624.

Poids de SO^4 pour 100 gr. de cendres : 7 gr. 320.

Soufre soluble.

La détermination du soufre soluble a été effectuée de la façon suivante :

Dix centimètres cubes de sang sont traités par 10 centimètres cubes d'acide azotique au 1/2, on agite

et on filtre. 10 centimètres cubes du filtrat, soit 5 centimètres cubes de sang sont additionnés d'acide chlorhydrique et de chlorure de baryum au 1/10. Il se forme un précipité. On laisse déposer 12 heures, on entraîne le précipité, de sulfate de baryte formé sur un filtre sans cendres, on lave par de l'eau acidulée d'acide chlorhydrique et on opère comme pour le soufre total.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Poids de la capsule vide : 38 gr. 7054.

Poids de la capsule avec cendres : 38 gr. 7099.

Poids de SO^4Ba correspondant à 5 centimètres cubes de sang : 0 gr. 0045.

Poids de SO^4Ba par litre : $0,0045 \times 200$.

Poids du soufre par litre :

$$0,0045 \times 200 \times 0,13734 = 0 \text{ gr. } 1236.$$

Poids de SO^4 par litre : 0 gr. 3708.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Nous avons opéré sur le double de sang, soit 20 centimètres cubes, et, par suite, 20 centimètres cubes d'acide azotique.

Poids de la capsule de platine vide : 38 gr. 704.

Poids de la capsule de platine avec SO^4Ba : 38,7120.

Poids du SO^4Ba pour cmc. de sang : 0,0086.

Poids du SO^4Ba par litre : $0,0086 \times 100$.

Poids du soufre par litre :

$$0,0086 \times 100 \times 0,13734 = 0 \text{ gr. } 118.$$

Poids de SO^4 par litre : 0,3543.

Soufre organique.

Le soufre organique est la différence entre le soufre total et le soufre soluble.

SANG D'*HELIX POMATIA* L EN HIBERNATION

Soufre organique par litre :

$$0,1318 - 0,1236 = 0 \text{ gr. } 0082.$$

Poids de SO^4 formé d'origine organique : 0 gr. 0246.

Une détermination faite directement sur les matières albuminoïdiques du sang nous a permis de contrôler ce résultat.

Nous avons opéré, en effet, sur 20 centimètres cubes de sang, de la façon suivante ; on précipite par 10 centimètres cubes d'acide azotique les matières protéiques du sang dans une capsule en porcelaine ; on jette le tout sur un filtre sans cendres ; on lave, à plusieurs reprises, par de l'eau acidulée par de l'acide azotique, la capsule et le précipité. On entraîne ce dernier dans un vase d'Erlenmeyer de 125 centimètres cubes et on opère comme pour le soufre total, mais avec 20 centimètres cubes de perhydrol et 20 centimètres cubes d'acide azotique. On aura enfin le poids du soufre par litre en multipliant le poids de sulfate de baryum par 50 et 0,13734.

Poids de la capsule vide : 38,7054.

Poids de la capsule avec cendres : 38,7074.

Poids du SO^4Ba correspondant à 20 cmc. : 0,002.

Poids du soufre par litre :

$$0,002 \times 50 \times 0,13734 = 0,0137 \text{ soufre par litre.}$$

Poids de SO^4 par litre : 0,0411.

Donc, présence de traces de soufre organique.

SANG D'*HELIx POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Soufre organique : 0 gr. 1208 — 0 gr. 1181 = 0 gr. 0029.

Poids de SO^4 formé d'origine organique : 0 gr. 0087.

Nous concluons à la présence certaine de soufre organique, mais à l'état de traces.

CONCLUSIONS. — *Le soufre existe dans le sang, à l'état de traces de soufre organique, et surtout sous forme de sulfates solubles.*

E. — Cuivre

Historique.

Nous ne pouvons entreprendre l'exposé de ce chapitre, sans rappeler les travaux effectués pour la recherche du cuivre dans la série animale.

C'est ERMAN, en 1817, qui, le premier, étudiant le sang de l'*Helix pomatia L*, annonce que le cuivre existe à l'état normal dans la série animale. HARLESS et VON BIBRA, DE WITTING trouvent le cuivre chez les crustacés. GENTH, en 1869, retrouve le cuivre dans le sang des Limules. LEHMANN et DE GUENTI effectuent toute une série de travaux sur la présence du cuivre chez les animaux terrestres. FRÉDÉRICQ, en 1878, dans sa note sur l'*hémocyanine*, substance nouvelle du sang de poulpe, émet que le sang de ce céphalopode contient une seule matière albumnoïde bleue *hémocyanine* capable de fixer l'oxygène, où le *cuivre* entre comme élément constitutif. RAPHAEL DUBOIS, en 1900,

dose le cuivre dans la série animale. Il opère sur des cœlentérés, vers, échinodermes, crustacés, mollusques, tuniciers, vertébrés. DHÉRÉ, la même année, dose le *cuivre hématique* chez les invertébrés et en particulier sur l'*Helix pomatia* L.

Nous avons tenu à vérifier la présence de cet élément dans le sang de l'escargot.

Recherche qualitative du cuivre.

Nous nous sommes servis, pour cette recherche, du réactif de KASTLE-MEYER. Il possède en effet la propriété de donner, en présence de traces de cuivre, une coloration rose, très nette, accentuée par la présence de glycérine. La sensibilité de la réaction est extrêmement grande. On obtient une coloration rosée, avec une solution contenant 10^{-8} de cuivre, en opérant avec 10 centimètres cubes de solution à laquelle on ajoute quatre gouttes de réactif, une goutte d'eau oxygénée à 5 ou 6 volumes et une goutte de glycérine. Mais il faut opérer sur une solution ne contenant que des matières minérales.

Nous avons dû, dans ce but, effectuer une destruction des matières organiques de l'*Helix pomatia* L.

Pour cela, 20 centimètres cubes de sang sont versés dans une capsule de porcelaine de 200 centimètres cubes. On ajoute 5 centimètres cubes d'acide sulfurique et 15 centimètres cubes d'acide azotique (vérifiés exempts de cuivre à l'aide du réactif Kastle-Meyer lui-même). Une coloration jaune intense, due à la formation de composés xanthoprotéïques, apparaît. On place la capsule sur un bain de sable en

tôle chauffé par un brûleur Bunsen, avec couronnement *en fer*. On la recouvre d'un entonnoir retourné, de diamètre un peu inférieur.

Par son sommet, on fait passer un tube effilé, terminé en entonnoir à sa partie supérieure, qui permet d'ajouter goutte à goutte de l'acide azotique pur pendant la destruction de la matière organique. On chauffe d'abord doucement, puis plus énergiquement, en ajoutant de temps en temps de l'acide azotique que l'on répartit sur toute la masse, qui se fluidifie peu à peu. Le liquide, d'abord très coloré, finit par devenir presque incolore. L'opération dure six heures environ. On obtient une liqueur très légèrement vert pâle. On chauffe jusqu'à apparition de vapeurs blanches d'acide sulfurique. On laisse refroidir. On ajoute avec précaution, pour éviter un trop grand dégagement de chaleur, de l'eau bidistillée. Cette eau a été préparée dans un appareil en verre, pour éviter l'apport de traces de cuivre. On porte à l'ébullition. On laisse refroidir. La liqueur est diluée, puis neutralisée par de la soude pure. A 10 centimètres cubes de la solution obtenue, on ajoute une goutte de glycérine, quatre gouttes de réactif et une goutte d'eau oxygénée à 5 à 6 volumes. On obtient une belle coloration rose.

CONCLUSIONS. — *Le sang d'Helix pomatia L contient du cuivre*. Nous ne reviendrons pas sur les dosages de cet élément. DHÉRÉ, dans son étude sur la capacité respiratoire de l'hémocyanine, a dosé le cuivre dans le sang de l'*Helix pomatia L*. Il s'est servi

dans ce but d'une technique spéciale, identique à celle de M. LAPICQUE pour le dosage du fer. Il a opéré sur du sang d'escargot, dont il a détruit la matière organique par le procédé azoto-sulfurique. Il a séparé le cuivre par électrolyse de la liqueur, en milieu légèrement azotique. Il a obtenu, comme l'a montré LUKOW, un dépôt exclusif de cuivre à la cathode. La détermination de la quantité de cuivre déposée aurait pu être effectuée par pesée, mais l'auteur a eu recours au dosage colorimétrique plus sensible, en profitant de la réaction du ferrocyanure de potassium sur les sels de cuivre. Mais une trace d'acide azotique libre modifie la coloration. DHÉRE ne pouvant évaporer à siccité par la chaleur l'azotate de cuivre sans le décomposer, a opéré dans le vide, à la température du laboratoire.

Nous nous contentons de rappeler les résultats obtenus.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

5 décembre :

100 cmc. de sang ont donné 7 mgr. 5 de cuivre.

Poids du cuivre par litre : 0 gr. 075.

Poids du cuivre pour 100 gr. de cendres : 0 gr. 961.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

5 mai :

100 cmc. de sang ont donné 12 mgr. de cuivre.

Poids du cuivre par litre de sang : 0 gr. 120.

Poids du cuivre pour 100 gr. de cendres : 2 gr. 424.

F. — Métaux alcalins

L'indosé est constitué surtout par les métaux alcalins, *potassium*, *sodium* en grande quantité, et *lithium* à l'état de traces, comme nous l'a montré l'analyse qualitative.

Nous avons obtenu leur proportion par différence entre le poids total des cendres et la somme des autres éléments dosés.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Pour 100 gr. de cendres, il existe :

35 gr. 440 de métaux alcalins,
soit 2 gr. 76 par litre de sang.

SANG D'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Pour 100 gr. de cendres, il existe :

28 gr. 889 de métaux alcalins,
soit 1 gr. 43 par litre de sang.

En résumé, 100 gr. de cendres du sang d'*Helix pomatia L* sont ainsi constitués :

	En hibernation	en vie active
Chlore	45,511	45,894
Chaux	5,640	6,585
Magnésie	7,051	8,060
P ² O ⁵	0,333	0,828
SO ⁴	5,064	7,320
Cuivre	0,961	2,424
Métaux alcalins ..	35,440	28,889
	100 gr.	100 gr.

ÉLÉMENTS ORGANIQUES DU SANG

A. — Glucose

Glucose libre du sang.

La détection du glucose libre dans le sang de l'escargot a, depuis longtemps, attiré l'attention des auteurs. En effet, dès 1900, le professeur RAPHAEL DUBOIS, ayant fait une étude du sang de l'*Helix Pomatia* L, concluait à l'absence du glucose pendant l'hibernation. En 1902, M. COUVREUR, faisant des recherches sur le sang du « *Murex* », y mettait en évidence de très faibles quantités de glucose libre. Etendant son étude au sang d'escargot, il ne trouvait de glucose, ni pendant l'hibernation, ni pendant la vie active, l'animal étant à jeun. Le 4 mars 1905, M. SEILLIÈRE, découvrait, dans le suc gastro-intestinal de l'escargot une diastase hydrolysant la Xylane avec production de sucre de la série des pentoses et des traces d'hexoses. La même année, Maurice PACAUT étudiait les propriétés amylolytiques de la salive d'escargot. C'est alors que M. COUVREUR et Mlle MARGUERITE BELLION publiaient une note sur le sang d'escargot, où ils annonçaient l'absence de glucose dans

les différents états de vie de l'animal. Que devenaient les produits de dédoublement signalés par M. SEILLIÈRE ? Cet auteur fit des recherches sur la présence des pentoses et des hexoses dans le sang, à l'aide de la phloroglucine, en milieu chlorhydrique. Il obtint une réaction positive. Ce résultat fut contesté par M. COUVREUR, qui ne put obtenir la formation de phénylglucosazones. Dans une note publiée comme réponse, M. SEILLIÈRE, nourrissant des escargots avec de la mie de pain et les sacrifiant six heures après l'ingestion, recherchait le glucose dans le sang après concentration et parvenait à former des phénylglucosazones caractéristiques, mais M. COUVREUR, objectant le régime très spécial de nourriture, concluait qu'en temps normal le glucose n'existait pas dans le sang.

En 1909, Mlle M. BELLION observait l'absence totale de sucre chez l'*Helix pomatia* L en vie active, au début et à la fin de l'hibernation. Elle trouvait au contraire, pendant le milieu de celle-ci, des quantités très faibles de glucose, mises en évidence par la réduction de la liqueur de felhing, quantité suffisante pourtant pour permettre, dans certains cas, la formation de phénylglucosazones.

Nous nous sommes proposés de rechercher le glucose libre dans les deux états de vie, et nous avons été conduits à compléter notre travail par l'étude du glucose protéidique et de la glycolyse.

Pour effectuer ces dosages, nous nous sommes servis de la méthode de picrato-picrique de M. W MESTREZAT et de Mlle Y. GARREAU, modification de la méthode LEWIS et BÉNÉDICT. Cette méthode est basée

sur la réduction par le glucose de l'acide picrique en acide picramique, en présence du carbonate de soude. On évalue colorimétriquement la quantité d'acide picramique formée, quantité qui est proportionnelle au glucose libre. C'est une méthode très sensible et qui exige peu de matière première, mais elle n'est applicable qu'à des liquides peu albumineux. Sur les conseils de M. LEULIER, nous l'avons adoptée pour nos mesures. Cet auteur a trouvé, en effet (*recherches inédites*), qu'elle pouvait être étendue à l'analyse du sang humain, liquide plus riche en matières protéïques que le sang d'escargot, à la condition d'utiliser comme déféquant *le réactif de Bougault*.

Les réactifs nécessaires aux dosages sont les suivants :

1° *Réactif de Bougault* :

Chlorure de sodium pur, 15 gr.

Acide acétique cristallisable, 1 centimètre cube.

Eau distillée, q. s. p., 100 centimètres cubes.

2° *Solution picrato-picrique* :

Acide picrique pur, 36 gr.

Solution de soude à 1 %, 500 centimètres cubes.

Eau q. s. p., 1000 centimètres cubes.

On dissout 36 gr. d'acide picrique recristallisé et finement pulvérisé, dans 500 centimètres cubes d'une solution de soude titrée à 1 % (10 centimètres cubes de solution = 25 centimètres cubes de soude N/10) additionnée de 400 centimètres cubes d'eau chaude. On agite, on refroidit après dissolution et on complète au litre. Le léger dépôt qui peut se former au fond du flacon est sans inconvénient, on usera que la partie claire.

3° *Solution carbonatée :*

Carbonate de soude pur anhydre, 20 gr.

Eau, q. s. p., 100 centimètres cubes.

4° *Solution sucrée étalon :*

Glucose anhydre pur, 10 gr.

Eau distillée bouillie, 1000 centimètres cubes.

Toluène, 3 centimètres cubes.

Diluée au 1/20, permettra d'obtenir la solution témoin à 0 gr. 50 par litre.

TECHNIQUE :

5 centimètres cubes de sang sont additionnés de 5 centimètres cubes de *réactif de Bougault*. On porte 3 minutes au bain-marie, on filtre pour éliminer le précipité formé, 4 centimètres cubes de filtrat qui représentent 2 centimètres cubes de sang. On le neutralise par du carbonate de soude (indicateur: papier de tournesol sensibilisé). On y ajoute 2 centimètres cubes de liqueur picrato-picrique et 0 cmc. 5 de carbonate de soude à 20 %.

On prépare parallèlement un témoin avec 2 centimètres cubes de solution sucrée à 0 gr. 50 par litre, 2 centimètres cubes de liqueur picrato-picrique et 0 cmc. 5 de carbonate de soude à 20 %. Les deux tubes avec leur contenu sont plongés simultanément dans un bain-marie bouillant durant 10 à 12 minutes. Ce temps écoulé, on retire les tubes et on les refroidit, on étend leur contenu à 12 cmc. 5, la lecture est faite au colorimètre, on amène à égalité de teinte, la quantité de glucose en grammes, par litre de sang, est donnée par l'équation

$$x = 0,50 \times \frac{h}{h'}$$

h étant la division de l'échelle du tube étalon,
 h' celle de la solution à étudier.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Après avoir opéré comme il a été dit, la liqueur à étudier a très légèrement réduit l'acide picrique, en effet, par comparaison avec un tube ne contenant que de l'eau distillée additionnée de solution picrique, nous avons constaté une coloration légèrement plus brune, mais la teinte ne peut être comparée à celle de l'étalon à 0 gr. 50 par litre. En diluant cet étalon au 1/4, nous avons trouvé les valeurs suivantes en prenant pour

$$h = 10 \quad h' = 32$$

$$\text{Donc } x = \frac{0,125 \times 10}{16} = 0 \text{ gr. } 078 \text{ par litre}$$

On peut considérer comme sensiblement nulle la quantité de glucose par litre, car nous sortons des limites de précision du dosage.

SANG DE L'*HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE :

Nous avons également une très légère réduction, mais qui n'est pas plus appréciable qu'en hiver.

CONCLUSIONS. — *Nous concluons donc à l'absence probable de glucose libre en hiver et en vie active ; dans les deux cas d'ailleurs, nous n'avons pu mettre en évidence la moindre réduction de la liqueur de felhing.*

Glucose protéidique.

Existe-t-il dans le sang de l'*Helix pomatia* L du glucose protéidique? Aucune étude sur le sucre combiné dans le sang des invertébrés n'a été effectuée jusqu'à nous. La détermination courante dans le sang humain et les travaux de LÉPINE et BOULUD, nous ont décidé à étudier ses variations dans le sang de l'*Helix pomatia* L. La méthode consiste à hydrolyser les glucoprotéïdes par l'acide sulfurique dilué et à doser le glucose ainsi mis en liberté. La technique que nous avons employée est la suivante :

Dix centimètres cubes de sang, tout fraîchement prélevé, sont placés avec 10 centimètres cubes d'eau acidulée par l'acide sulfurique, au 1/10 dans un flacon à fermeture mécanique et à paroi mince. On ferme soigneusement le flacon que l'on place dans un autoclave, que l'on maintient à 120° pendant 40 minutes, on laisse refroidir et on dose comme précédemment, en multipliant el résultat par 2.

SANG DE L'*HELIX POMATIA* L EN HIBERNATION :

Nous avons opéré le 15 janvier :

$$h = 10 \qquad h' = 11$$

$$x = \frac{0,5 \times 10}{11} \times 2 = 0 \text{ gr } 91 \text{ par litre}$$

SANG DE L'*HELIX POMATIA* L EN VIE ACTIVE :

Nous avons opéré le 25 mai :

$$h = 30 \qquad h' = 8$$

$$x = \frac{0,50 \times 30}{8} \times 2 = 3 \text{ gr. } 75 \text{ par litre}$$

CONCLUSIONS. — *Il existe dans le sang une forte proportion de glucose combiné beaucoup plus élevée en été qu'en hiver.*

Glycolyse dans le sang.

D'après les mesures précédentes, nous voyons que le sucre combiné en hiver est en très petite quantité dans le sang, comparativement à la proportion des matières albuminoïdes existantes. Au contraire, en vie active, le sucre protéïdique, près de 4 fois 1/2 plus abondant par litre, est en forte proportion en comparaison du taux de protéïnes. Nous avons fait alors l'hypothèse suivante :

Pendant la période estivale, l'escargot, s'alimentant de substances riches en hydrates de carbone, accumule du glucose à l'état de glucoprotéïdes. Ces glucoprotéïdes serviront de réserves et permettront par leur dédoublement, à l'animal en hibernation, de subsister. Mais, comme le sang riche en sucre combiné ne contient pas de sucre libre, nous avons pensé que le sang d'escargot devait avoir un *pouvoir glycolytique* appréciable.

Nous l'avons mis en évidence de la façon suivante : nous avons lavé très soigneusement, à l'eau, puis stérilisé par un lavage à l'alcool à 95° et à l'éther, les coquilles de cinq escargots, que nous avons cassées ensuite avec un petit marteau, stérilisé à la flamme. Après section de l'oreillette, à l'aide de ciseaux également stérilisés, nous avons placé, selon notre méthode habituelle, ces escargots ainsi traités sur des entonnaires et tubes à essai stériles. Au mélange aseptique

de sang des différents tubes, nous avons ajouté une proportion quelconque de glucose : après agitation et dissolution, à l'aide d'une pipette stérilisée, nous avons pris 1 cmc. 5 de sang, que nous avons placé dans un tube à essai contenant du fluorure de sodium. Le reste du sang, non fluoré, a été conservé dans un tube à essai stérilisé. Ce tube, a été bouché à l'aide d'un tampon de coton hydrophile flambé, et nous l'avons laissé séjourner, pendant trente heures, à la température du laboratoire; l'escargot, étant un animal à sang froid, il était inutile de le placer dans une étuve pour que la glycolyse puisse s'effectuer, si elle a lieu normalement. Après ce laps de temps, nous avons dosé le glucose dans les deux tubes.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1° SANG FLUORÉ. — Nous avons lavé le tube contenant le sang fluoré, nous avons complété très exactement à 5 centimètres cubes. On a ajouté, alors, 10 centimètres cubes de *réactif de Bougault*, on filtre, on en prend 0 cmc. 5 et on étend à 2 centimètres cubes. On compare, comme dans les autres dosages de glucose, avec le témoin contenant 0 gr. 5 par litre.

Etalon : 2 cmc. = 1 mgr. de glucose, H = 10.

Liquide : H = 5.

Glucose pour 1 cmc. 5 de sang :

$$\frac{1 \text{ mgr.} \times 10 \times 15}{5 \times 0,5} = 0 \text{ gr. } 06$$

$$\text{soit par litre } \frac{0,06 \times 1000}{1,5} = 40 \text{ gr.}$$

2° SANG NON FLUORÉ. — Glucose pour 2 cmc. 5 :

$$\frac{1 \text{ mgr.} \times 20 \times 10}{4,2 \times 0,5} = 9 \text{ cgr. } 52$$

et par litre : 38 gr. 10.

notablement inférieur au sang fluoré, donc glycolyse 1 gr. 90 de sucre ont disparu par litre de sang en 36 heures.

Nous avons opéré avec de fortes proportions de glucose, car, d'après MAURICE PIERRE, la glycolyse est plus marquée dans le sang humain, vis-à-vis d'une solution riche en glucose, que si elle s'effectue seulement sur le sucre sanguin.

CONCLUSIONS. — 1° *Le sang d'escargot ne paraît pas contenir de quantités appréciables de glucose libre.*

2° *Il renferme par contre du glucose combiné qui se libère par hydrolyse sulfurique. On en rencontre davantage en vie active qu'en vie ralentie.*

3° *Le pouvoir glycolytique est peu marqué, mais appréciable cependant.*

B. — Cholestérine

La cholestérine, découverte en 1775, par CONREDI, a été analysée par CHEVREUL, et caractérisée comme alcool, par BERTHELOT, en 1859. Ceci s'entend pour la cholestérine humaine. BENEKE, en 1862, a découvert, dans l'huile d'olive, les jeunes pousses d'herbes, un

produit appelé plus tard la « *phytostérine* », présentant les mêmes propriétés chimiques et réactions colorées que la cholestérine des calculs biliaires.

HESSE, en 1878, montrait que la cholestérine, extraite par lui de la *fève de Calabar*, était différente de la cholestérine humaine. Son point de fusion moins élevé, et son pouvoir rotatoire plus faiblement levogyre, en étaient la preuve évidente.

JACOBSON, en opérant sur diverses légumineuses (haricots, pois, lupin), prouvait l'existence de plusieurs variétés de phytostérines. BOMER et WINTER, à partir de matières grasses végétales (huile d'œillette, de coton, d'arachide, etc...), ont obtenu, eux aussi, des stérols dont les formiates, acétates, propionates, butyrates présentaient des différences irréductibles, comme aussi les alcools dont ils dérivait.

TANRET isolait, de l'ergot de seigle, un phytostérol, l'*ergostérine*, qui ne ressemblait que très imparfaitement aux stérols des phanérogames.

GÉRARD, en opérant sur le *Penicillium glaucum*, l'*Æthelium septicum*, la levure de bière, le *staphylocoque blanc*, le *Mucor mucedo*, etc..., a obtenu des phytostérines voisines de celle de TANRET, mais différentes aussi des cholestérines phanérogamiques. Dès lors, il est un fait admis qu'il existe, dans le règne végétal, plusieurs phytostérines.

Pour les zoostérols, les recherches n'ont pas mis en évidence de différences aussi nettement tranchées. Pour préciser, il n'y a pas deux groupes de zoostérols : l'un, pour les vertébrés, l'autre, pour les invertébrés. Cependant, dans un important travail, CHARLES DORÉE

a étudié la distribution de la cholestérine et des corps voisins dans la série animale. De ces recherches, les conclusions sont les suivantes : chez les vertébrés, c'est toujours la cholestérine elle-même qui se présente, mais elle est parfois remplacée par des corps voisins chez certains invertébrés ; tous ces composés ont pour formule $C^{27} H^{46} O$ et présentent des différences surtout dans leur forme cristalline et les points de fusion de leurs acétates et de leurs bibromures. CHARLES DORÉE, a étudié la répartition du cholestérol chez le lapin, le serpent, le maquereau, le buccin, le crabe, le gardon, le gros ver, l'étoile de mer, le cliona et l'éponge. Comme il n'a point abordé cette recherche chez l'escargot, nous avons tenu à combler cette lacune. L'identification du zoostérol de l'escargot, avec la cholestérine humaine, était, en dehors de toute autre considération biologique, absolument nécessaire, puisque nous voulons nous servir pour la doser des méthodes analytiques suivies pour le sang humain.

Extraction de la cholestérine de l'escargot

Pour faire l'étude de cette cholestérine, il nous fallait une certaine quantité de produit pur et nous ne nous adresserons pas seulement à la cholestérine du sang d'escargot, mais à la cholestérine totale.

Trois kilos d'escargots en hibernation et operculés, qui nous avaient servi à un des prélèvements du sang, ont été placés de suite après la saignée dans un grand bocal de cinq litres, à assez large ouverture, et bouchant à l'éméri. L'état de jeûne des escargots

exclut toute cause d'erreur due à l'apport de phytostérine. Quatre litres d'éther éthylique environ ont été ajoutés, de façon à immerger complètement les escargots. On les a laissés ainsi en macération pendant un mois, en agitant de temps en temps. L'éther s'est légèrement coloré en jaune et au fond du récipient s'est déposé un liquide épais, brun, visqueux, déplacé par l'éther, d'une odeur très désagréable.

Après cette longue macération, nous avons décanté l'éther avec précaution et filtré dans un grand cristalliseur, où nous l'avons abandonné à l'évaporation spontanée. Pendant l'évaporation, le liquide d'abord d'une limpidité parfaite et légèrement jaune foncé, se trouble peu à peu. Après évaporation de tout l'éther, il reste un résidu aqueux, que l'on transvase dans un petit cristalliseur en verre mince, où l'on entraîne avec du chloroforme toute la cholestérine et les substances grasses, qui adhèrent aux parois du premier. On achève l'évaporation au bain-marie, on ajoute alors au résidu de la solution alcoolique de potasse à 25 % et l'on place ce liquide dans une fiole conique, qu'on laisse au bain-marie une heure, au réfrigérant ascendant, pour saponifier les corps gras. La coloration du liquide est alors vert très foncé, presque noir. On évapore à sec, on dissout dans l'eau, on agite le liquide avec de l'éther dans une ampoule à décantation. L'éther dissout la cholestérine non saponifiable. La couche inférieure est une solution de savons. Au bout de dix minutes, on décante la couche inférieure, on doit épuiser deux fois à l'éther. L'éther contient alors sensible-

ment toute la cholestérine ; on le verse dans un cristalliseur et on fait évaporer. On obtient, après évaporation complète, une masse cristalline, jaunâtre, légère, d'aspect gras. On dissout cette masse dans de l'alcool à 95° chaud. On laisse refroidir le liquide, la cholestérine cristallise en belles et grandes lames très minces. On fait deux cristallisations successives. On verse le tout sur un filtre sans pli et on lave les cristaux avec de l'alcool à 70°. Le filtrat et les alcools de lavage sont recueillis et donneront par évaporation de la cholestérine impure. La cholestérine restée sur le filtre est pure, on la met dans un verre de montre, on la porte à l'étuve à 100°. On la laisse séjourner pendant cinq heures et l'on obtient ainsi la cholestérine anhydre.

Etude de la cholestérine de l'*Helix Pomatia* L

La cholestérine de l'*Helix pomatia* L se présente sous forme de belles écailles brillantes, nacrées, inodores, grasses, onctueuses au toucher. Elle est soluble dans l'alcool absolu bouillant. Sa solubilité diminue en même temps que le degré alcoolique ; très soluble dans l'éther éthylique, le chloroforme, le sulfure de carbone, la benzine ; insoluble dans l'eau.

Point de fusion.

La détermination du point de fusion instantané a été faite au moyen du bloc de MAQUENNE, en descendant. Les lectures n'ont pu être faites avec une erreur absolue moindre de 1°. La première

lecture a donné comme point de fusion + 147,5.
La deuxième, + 148°.

Détermination du pouvoir rotatoire.

Le pouvoir rotatoire de la cholestérine de l'*Helix pomatia* L a été déterminé à l'aide du polarimètre à pénombre de LAURENT, en lumière monochromatique jaune au tube de deux décimètres, avec toutes les précautions d'usage.

Poids de la cholestérine dissoute dans le chloroforme : $p = 0,670$.

Volume de la dissolution chloroformique : 100 cmc.

α observée = 0,50

$$D = \frac{0,50 \times 100}{2 \times 0,670} = - 37^{\circ} 30$$

Cholestérine humaine $\alpha - 37^{\circ} 1$

Formes cristallines.

a) Cristallisation dans l'éther.

On prend quelques centigrammes de cholestérine pure, on les dissout dans l'éther anhydre, on place une goutte de la solution sur une lame de microscope, on laisse évaporer, on ajoute une deuxième goutte, on place entre lame et lamelle et on regarde au microscope ; on voit de longues aiguilles anhydres fines et brillantes comme la soie.

b) Cristallisation dans l'alcool absolu.

En opérant comme pour l'éther, on obtient de belles grandes lames monocliniques très minces, présentant souvent des troncatures à angle aigu.

Réactions colorées.

Réaction de Salkowsky.

On verse deux centimètres cubes d'une solution chloroformique de cholestérine dans un tube à essai, on y ajoute deux centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, additionné d'un cinquième de son volume d'eau ; il se produit une coloration rouge sang dans le chloroforme, coloration virant au jaune clair, avec fluorescence verte par agitation. Si on ne mélange pas l'acide sulfurique et la solution chloroformique, il se produit un anneau rouge cerise à la surface de séparation des deux liquides.

Réaction de Lieberman.

Dans une solution chloroformique de cholestérine, on ajoute dix gouttes d'anhydride acétique, puis une goutte d'acide sulfurique concentré ; il se développe une coloration rose très fugace, virant au bleu et enfin au vert.

Cette réaction très importante sera utilisée pour le dosage de la cholestérine dans le sang de l'*Helix pomatia* L.

Réaction de Denigès.

On ajoute à une solution chloroformique de cholestérine un demi-volume d'acide sulfurique ; la réaction Salkowsky apparaît, c'est-à-dire l'acide sulfurique devient fluorescent et la solution chloroformique de cholestérine se colore en rouge. Dans la couche surnageante, on fait tomber III gouttes d'anhydride acétique, il se développe une teinte carmin virant au violet.

Essai de l'acétate de cholestérine

Nous avons formé de l'acétate de cholestérine suivant le procédé BRUNO. 50 centigrammes de cholestérine pure sont placés dans une capsule et additionnés de deux à trois centimètres cubes d'anhydride acétique, la capsule est recouverte d'un verre de montre. On chauffe sur une petite flamme pendant une minute jusqu'à ébullition. On enlève le verre de montre et on évapore au bain-marie l'excès d'anhydride acétique.

Le résidu est dissous à chaud dans la plus petite quantité possible d'alcool absolu ; on ajoute encore quelques centimètres cubes d'alcool, pour empêcher la solidification immédiate de la masse par refroidissement, et on abandonne à la cristallisation. Lorsqu'un tiers ou la moitié de l'alcool s'est évaporé spontanément, l'acétate cristallise. On sépare les cristaux par filtration sur un petit filtre et on les lave avec un peu d'alcool à 95°. On les redissout dans la capsule avec 5 à 10 centimètres cubes d'alcool ; on fait recristalliser ; on sépare de nouveau les cristaux par filtration et sur cette seconde récolte de cristaux, on procède à la détermination du point de fusion.

Les cristaux d'acétate de cholestérine formés fondent au bloc de Maquenne à 114°5-115°. L'acétate de cholestérine humaine, d'après BRUNO, fond à 114°3-114°8.

CONCLUSIONS. — *En définitive, la cholestérine de l'escargot cristallise dans l'éther et l'alcool, comme*

la cholestérine humaine. Elle donne les mêmes réactions colorées ; son point de fusion 148°, son pouvoir rotatoire — 37°3, le point de fusion de son acétate 114°5 permettent de conclure que la cholestérine de l'escargot est la même que la cholestérine humaine, cette dernière ayant comme point de fusion 148°5, comme pouvoir rotatoire — 37°1, et comme point de fusion de l'acétate 114°3-114°8.

Dosage de la cholestérine dans le sang d'*Helix Pomatia* L

La méthode employée est basée sur la coloration verte que donne la cholestérine en solution chloroformique, quand on ajoute à cette solution de l'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique. Dans une ampoule à robinet, on mesure 2 centimètres cubes de sang et 13 centimètres cubes d'alcool sodé (alcool à 60°, 100 centimètres cubes, soude caustique, 0 gr. 50). Au mélange, on ajoute 15 centimètres cubes d'éther, on agite de nouveau et on laisse reposer. On soutire la couche aqueuse inférieure et on la remplace par 20 centimètres cubes d'eau, que l'on fait couler le long des parois. Après 5 minutes de repos, on procède à un nouveau lavage. L'éther séparé est alors versé dans une petite capsule de porcelaine et évaporé. Le résidu est dissous dans 5 centimètres cubes de chloroforme qu'on introduit dans un tube à essai. On y ajoute 5 centimètres cubes d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique ; on abandonne le tout au repos pendant une demi-heure. D'autre part, on a préparé

une solution étalon renfermant 4 centigrammes de cholestérine pour 100 centimètres cubes de chloroforme. 5 centimètres cubes de cette solution sont étendus à 50 centimètres cubes ; on en mesure 5 centimètres cubes et on traite de la même manière. Il est important de se servir, pour l'acide sulfurique, d'un compte-goutte normal et de verser exactement III gouttes.

Au bout d'une demi-heure, on compare au colorimètre DUBOSCQ la coloration verte de chacun des tubes.

Soit h la division du tube de l'étalon, h' celle du liquide à étudier.

Si on a égalité de teinte quand h égale h' , on a :

$$\frac{0,04}{2} \times 5 = 0,10 \text{ de cholestérine par litre.}$$

Pour avoir la teneur x en cholestérine pour h différent de h' , il suffira de multiplier

$$\frac{h}{h'} \text{ par } 0,10, \quad x = \frac{h}{h'} \times 0,10$$

SANG D'*HELI*X *POMATIA* L EN HIBERNATION

$$h = 15 \qquad h' = 37$$

$$x = \frac{15 \times 10}{37} = 4 \text{ centigrammes par litre de sang.}$$

SANG D'*HELI*X *POMATIA* L EN VIE ACTIVE

$$x = \frac{15 \times 10}{27} = 1 \text{ centigr. 8 par litre.}$$

CONCLUSION. — *La cholestérine du sang d'escargot est la même que la cholestérine humaine et se trouve dans le sang d'hibernation en quantité supérieure au double de celle du sang de vie active.*

C. — Urée

Dosage de l'urée par la méthode à l'hypobromite de soude

Au sujet de la présence de l'urée dans le sang de l'*Helix pomatia* L, nous n'avons guère à citer que les travaux de M. COUVREUR, qui remontent à 1900. Cet auteur effectuait ses dosages par l'hypobromite de soude en milieu alcalin sur le sang total, c'est-à-dire sans le débarrasser des matières protéiques. Il trouvait par ce procédé, chez l'animal en hibernation, 3 gr. 20 d'urée par litre de sang, et chez l'escargot en vie active, 1 gr. 872. Nous avons repris ces dosages, en opérant de la même manière. Leur principe est basé sur la réaction suivante :

Quand on fait agir à froid de l'hypobromite de soude (BrONa) sur de l'urée, celle-ci se décompose en azote, acide carbonique et eau, d'après l'équation :



Si l'on opère en présence d'un excès de soude, l'acide carbonique est retenu et l'azote seul se dégage. Le volume d'azote fourni sera proportionnel

à la quantité d'urée décomposée. Par conséquent, si on fait agir sur un volume connu du liquide à étudier une solution alcaline d'hypobromite de soude et que l'on recueille l'azote qui se dégage dans la réaction, on pourra, par le calcul, en déduire la quantité d'urée contenue dans le volume employé.

Théoriquement, 1 gr. d'urée dégage 371 cmc. 2 d'azote mesuré à 0° et à 760 millim. Mais, en réalité, on n'obtient jamais plus de 92 % du chiffre théorique, le reste de l'azote étant oxydé et transformé partie en acide cyanique et partie en acide azotique.

D'autre part, la nécessité de ramener par le calcul les volumes gazeux à la température de 0° et à la pression de 760 millim. constitue une légère complication qu'on peut simplifier, en opérant parallèlement sur le liquide à étudier et sur une solution d'urée pure, d'une teneur connue.

Dans ces conditions, on n'a pas à s'occuper de la perte en azote et des corrections de température et de pression, pourvu que la lecture se fasse à la même température ; une simple proportion donnera la teneur en urée.

Nous nous sommes servis pour ces dosages de l'uréomètre d'AMBARD et des réactifs ci-après :

1° *Une solution d'hypobromite de soude*

On mélange :

Lessive de soude 50 gr.

Eau distillée 100 gr.

Puis on ajoute, peu à peu, en refroidissant et en agitant, 6 millimètres cubes de brome pur.

2° *Une solution titrée d'urée à 1/100*

1 gr. d'urée pure, cristallisée, finement pulvérisée et desséchée au préalable pendant 24 heures dans un exsiccateur à acide sulfurique, est dissous dans quelques centimètres cubes d'eau distillée ; on ajoute alors 1 gr. de phénol pur, pour assurer la conservation et on complète à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée. Un centimètre cube de cette solution contient un centigramme d'urée.

MODE OPÉRATOIRE. — Le robinet de l'uréomètre étant ouvert, on plonge la branche inférieure de l'appareil dans un verre conique contenant du mercure. A l'aide d'une pompe, ou trompe, reliée à la branche supérieure de l'appareil, on remplit complètement de mercure la branche inférieure. On prélève alors 10 centimètres cubes de sang. On les fait couler dans la branche supérieure de l'uréomètre, puis on ajoute III à IV gouttes de solution alcoolique de phtaléine, du phénol ; on alcalinise franchement à la soude. On ouvre avec précaution le robinet, de manière à faire passer le liquide dans la branche inférieure, en ayant soin de ne pas laisser entrer l'air. On lave deux fois le tube supérieur avec un peu d'eau distillée et on fait passer les eaux de lavage dans la partie inférieure ; deux à trois centimètres cubes d'eau distillée suffisent. On fait arriver alors 5 à 6 centimètres cubes d'hypobromite en prenant les mêmes précautions. Fermant l'ouverture avec le doigt, on retourne plusieurs fois l'appareil pour assurer le mélange ; on replace sur le mercure

comme précédemment ; on laisse en repos deux heures. Il s'est produit un faible dégagement gazeux. Afin d'évaluer son volume, on porte l'uréomètre dans une grande éprouvette pleine d'eau. On l'y abandonne pendant un quart d'heure, pour lui permettre de prendre la température du milieu extérieur et on fait la lecture en ayant soin d'égaliser les deux niveaux. Il faut retrancher 0,05 au nombre lu sur la graduation, car l'hypobromite renferme en dissolution un peu d'oxygène. On fait une seconde opération avec 1 centimètre cube de la solution d'urée au centième. Cette dernière nous a donné un dégagement d'azote de 3 cmc. 75, toute correction faite, pour 1 centimètre cube de la solution d'urée, soit 0 gr. 01 d'urée.

Nous avons opéré sur du sang d'escargot en pleine vie active. Nous avons obtenu un dégagement de 3 centimètres cubes, toute correction faite. Ce qui correspond à un taux d'urée de 0 gr. 80 par litre.

Analyse du gaz formé.

Le gaz est-il de l'azote ? Pour en reconnaître la nature, nous l'avons transvasé dans un tube fermé et gradué. Opérant sur la cuve à mercure, nous avons introduit dans le tube des pastilles de potasse caustique. Fermant la partie inférieure et retournant plusieurs fois le tube, nous avons lavé le gaz par la solution de potasse formée. Revenant sur la cuve à eau, nous avons, après refroidissement, évalué le volume du gaz. Le volume de gaz n'ayant pas changé, nous n'avions pas d'acide carbonique, comme il fal-

lait s'y attendre. Revenant sur la cuve à mercure, nous avons introduit par l'extrémité inférieure du tube de 0 gr. 75 de pyrogallol et de nouvelles pastilles de potasse. Lavant à nouveau le gaz et reportant le tube sur la cuve à eau, pour amener la température à celle du laboratoire, nous avons constaté une très faible diminution dans le volume gazeux, due, sans doute, à la présence de petites quantités d'oxygène dans les réactifs précédemment employés. Le gaz formé ne contient donc pas d'oxygène en proportion notable et paraît être de l'azote.

Ce gaz provient-il de l'urée ou des protéines sanguines ? Pour répondre à la question, nous avons effectué différents dosages sur du sang débarrassé au préalable des matières albuminoïdes. 5 centimètres cubes de sang récemment prélevés sont additionnés de 5 centimètres cubes de solution d'acide trichloracétique au 1/5. On mélange au mortier de verre et on filtre sur un filtre sans plis, en recueillant le filtrat. On en prélève 5 centimètres cubes, qui correspondent à 2 centimètres cubes de sang, et on opère comme précédemment. Nous avons effectué plusieurs dosages en vie active et en vie latente.

Résultats obtenus avec le sang de l'Hélix pomatia L.

1° EN HIBERNATION : Lecture faite, 0 cmc. 08. Volume réel d'azote, $0,08 - 0,05 = 0,03$ pour 2 c. 5 de sang. Urée par litre de sang

$$\frac{0,03 \times 400}{3,75} = 0 \text{ gr. } 032$$

Un deuxième dosage et un troisième nous ont donné les mêmes résultats.

2° EN VIE ACTIVE : La lecture faite est également 0 cmc. 08. Un deuxième dosage a donné les mêmes résultats.

CONCLUSION. — *Par la méthode à l'hypobromite en déféquant le sang, nous n'obtenons qu'une trace insignifiante d'urée dans les différents états de la vie de l'animal.*

Dosage de l'urée par la méthode gravimétrique au Xanthydrol de Fosse.

Nous avons tenu à vérifier les résultats précédents par la méthode gravimétrique au Xanthydrol de FOSSE, qui est une méthode de choix, offrant le maximum de certitude.

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction suivante : Le Xanthydrol ou diphénolpyranol O (C⁶H⁴)² CHOH, donne avec l'urée, dans certaines conditions expérimentales, de la *dixanthylurée*, corps insoluble, dont le poids moléculaire est exactement sept fois celui de l'urée. Il ne précipite ni l'acide urique, ni la guanidine, ni la créatinine, ni la créatine, ni les acides aminés, ni les polypeptides, mais seulement l'urée. Son emploi est donc tout indiqué pour les dosages de grande précision.

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

1° Le réactif de Tanret modifié :

Bichlorure de mercure	2 gr. 71
Iodure de potassium	7 gr. 20
Acide acétique cristallisable ..	66 cc.
Eau distillée q. s. p.....	100 cc.

2° Une solution au 1/10 de Xanthydrol dans l'alcool méthylique.

3° Acide acétique cristallisable.

Nous avons opéré sur 10 cc. de sang fraîchement prélevé, dont on précipite les matières albuminoïdes par 100 cc. de réactif de Tanret modifié. On centrifuge, on décante. On prélève 15 cc. de liquide que l'on verse dans un vase à précipiter, on ajoute 15 cc. d'acide acétique cristallisable, puis 4 cc. de solution alcoolique de Xanthydrol. On laisse reposer pendant une heure. On recueille, s'il y a lieu, le précipité sur un filtre taré et sec. On lave à l'alcool, puis on sèche à 100° et on le pèse. Le poids de xanthylurée formée, divisé par 7, donne le poids de l'urée dans la prise d'essai, c'est-à-dire 7 cc. 5 de sang. On multiplie par 133,33 pour avoir le poids de l'urée contenue dans un litre de sang.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN HIBERNATION

Le sang a été prélevé le 7 février 1925. Au bout d'une heure, pas de précipité de xanthylurée. Au bout de quatre heures, on observe une légère couche dans le liquide. Après centrifugation, l'examen microscopique montre la présence au fond du tube de très petits cristaux cubiques, complètement différents des aiguilles soyeuses de xanthylurée. Nous pouvons donc conclure à l'absence d'urée.

SANG DE *L'HELIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Les dosages ont été effectués le 12 mai, et les résultats ont été semblables aux précédents et nous n'avons pu obtenir de précipité de xanthylurée.

CONCLUSION. — *Nous concluons que le sang d'escargot convenablement déféqué ne donne pas les réactions d'un liquide renfermant de l'urée.*

D. — Acide urique

Nous avons utilisé, pour les dosages, le procédé de GRIGAUT, basé sur la coloration bleue qu'il donne avec le réactif phosphotungstique de FOLIN et DENIS. La teinte obtenue est comparée au colorimètre avec celle que donne dans les mêmes conditions une solution étalon d'acide urique.

Réactifs. — Les solutions nécessaires sont :

1° Réactif phosphotungstique

Placer dans un matras :

Tungstate de soude	20 gr.
Acide phosphorique à 60° B.....	16 gr.
Eau distillée	160 gr.

Faire bouillir le mélange pendant une heure, en plaçant un entonnoir dans le col du ballon. Laisser refroidir et compléter la solution à 200 cc. avec de l'eau distillée.

2° Une solution étalon d'acide urique

Dans un ballon de 250 cc., introduire 5 centigrammes d'acide urique pur en suspension dans quelques centimètres d'eau et ajouter de 100 à 125 centimètres cubes d'eau chaude, contenant en dissolution 0 gr. 50 de phosphate disodique pur et cristallisé, et 0,25 de phosphate monosodique cristallisé. Agiter le mélange

jusqu'à dissolution de l'acide urique, compléter à 250 cc. avec de l'eau distillée et ajouter quelques centimètres cubes de chloroforme pour empêcher le développement des bactéries.

Prendre 25 cc. de cette solution et compléter avec de l'eau distillée dans un ballon jaugé à 100 cc. Cette solution contient 0 gr. 05 par litre d'acide urique, ne la préparer qu'au moment du besoin.

TECHNIQUE

1° On prend 5 cc. de sang, que l'on défèque par 5 cc. d'acide trichloracétique à 20 %. On agite et on filtre.

On prend 5 cc. de filtrat, que l'on met dans une éprouvette, on ajoute 1 cc. de réactif phosphotungstique. Dans une deuxième éprouvette, on met 2 cc. 5 de solution d'acide urique à 0 gr. 05 par litre, puis 2 cc. 5 d'acide trichloracétique à 20 %, et enfin 1 cc. de réactif phosphotungstique.

On verse ensuite simultanément dans chacune des deux éprouvettes 15 cc. d'une solution saturée de carbonate de soude.

Une teinte bleue apparaît ; on compare immédiatement au colorimètre de Dubosc les teintes des deux solutions. La concentration en acide urique est donnée par la formule

$$x = \frac{h}{h'} \times 0,05$$

h étant la division du tube étalon,

h' étant celle de la solution à étudier.

SANG D'*HELIX POMATIA* L EN HIBERNATION

Février 1925. $h = 20$ $h' = 42$

$$x = \frac{20 \times 0,05}{42} = \frac{1}{42} = 0 \text{ gr. } 024 \text{ par litre.}$$

NOTA. — La teinte obtenue avec la solution sanguine est fugace.

SANG D'*HELIX POMATIA* L EN VIE ACTIVE

Mai 1925.

Nous avons obtenu une très légère coloration, mais non comparable à l'étalon.

CONCLUSIONS. — *Le sang d'Helix pomatia* L défectué donne, avec le réactif de Folin et Denis, une légère coloration bleue fugace. Mais ne pouvant isoler du sang en quantité appréciable pour identification, le produit, existant d'ailleurs à l'état de traces, qui réagit sur le réactif, nous ne concluons pas à la présence certaine de l'acide urique et par suite à ses variations, suivant l'état de vie de l'animal.

E. — Albuminoïdes

Historique.

Les recherches sur les substances protéiques dans les sangs hémocyaniques sont nombreuses. Dès 1878, FRÉDÉRICQ faisait l'étude des matières albuminoïdes du sang du poulpe commun. Il tentait de séparer par la chaleur les protéines de ce sang. Par une chauffe progressive, il constatait la formation d'un

louche à partir d'une température donnée ; puis, celle-ci étant maintenue constante pendant un certain temps, il obtenait par filtration un liquide incoagulable par l'ébullition même. De cela, il concluait à la présence d'une seule protéine. HALLIBURTON avait signalé l'existence de deux substances albuminoïdes. Il appelait l'une fibrinogène et concluait pourtant à la présence d'une seule protéine.

En 1892, HEIM, appliquant au sang des crustacés la méthode de séparation des albumines de CORNEVIN et BÉRARD, mettait en évidence la présence d'une seule globuline précipitant à 61°, presque identique à la paraglobuline et flocculant par addition de sulfate de magnésie en solution saturée. Le filtrat, par contre, renfermait de la sérine. GUÉNOT, plus tard, trouve du fibrinogène et de l'hémocyanine. Mais il prétend que le fibrinogène est le premier détruit en période de jeûne. Enfin, DAMBEAUVICCANU, étudiant récemment le sang d'*Helix pomatia* L, y trouve des globulines représentant un mélange d'euglobulines et de pseudoglobuline.

Nous avons fait alors une détermination qualitative des matières protéiques du sang.

Déterminations qualitatives des matières albuminoïdes

Nous avons fait agir sur le sang total certains réactifs :

La réaction du Biuret donne une superbe coloration violette.

L'acide azotique coagule le sang à chaud en le colorant en jaune.

Les réactifs de Tanret, l'acide picrique, l'acide trichloracétique fournissent d'abondants précipités.

Action de l'acide citrique.

Nous avons utilisé, pour cette recherche, le procédé préconisé par LÉCORCHÉ et TALAMON, mis au point par GRIMBERT et DUFAU.

Dans un tube à essai, nous avons versé quelques centimètres cubes de sang à l'aide d'une pipette effilée, et nous avons fait arriver par le fond du tube une solution sirupeuse d'acide citrique. Nous n'avons remarqué aucun anneau au contact des deux liquides. Mais si nous avions eu la formation d'un anneau, nous n'aurions pu assurer la présence de mucine, le sang étant alcalin et pouvant contenir des alcalis albumines et nucléo-albumines précipitables par l'acide citrique. *Nous concluons à l'absence de mucine.*

Action de l'acide azotique dilué.

5 centimètres cubes de sang sont étendus à 100 centimètres cubes à l'aide d'eau distillée. A 10 centimètres cubes de ce liquide, nous ajoutons 10 centimètres cubes de solution saturée de chlorure de sodium et deux gouttes d'acide azotique. Il se forme un trouble, puis, en portant à l'ébullition, il se forme un coagulum.

Le coagulum ne disparaît pas par refroidissement et tombe au fond du tube. Nous n'avons donc pas à faire seulement à des albumoses. Nous pouvons être en présence d'une ou plusieurs des protéines

suivantes : sérine, globuline, albumine acéto-soluble. Après filtration à chaud, le liquide filtré reste clair et ne donne pas la réaction du Biuret, donc *absence d'albumoses et peptones*.

Action du sulfate de soude et de l'acide acétique dilué.

Dans un verre à expérience, on verse 50 centimètres cubes de sang étendu et un excès de sulfate de soude pur, afin de saturer la solution. On verse quelques gouttes d'acide acétique au 1/10, jusqu'à réaction acide. On filtre dans un tube à essai que l'on remplit aux trois quarts. On chauffe la partie supérieure, jusqu'à commencement d'ébullition. Un louche abondant a pris naissance : *Présence d'albumine vraie, c'est-à-dire, sérine ou globuline*.

Recherche de l'albumine acéto-soluble.

On porte à l'ébullition du sang étendu d'eau distillée sans aciduler, mais après addition de 2 % de chlorure de sodium. Il se forme un coagulum ; on ajoute alors de l'acide acétique ; le précipité ne disparaît pas ; il est bien dû aux albumines vraies. Le filtrat, traité par de l'acide azotique, ne précipite pas même à l'ébullition.

Donc, absence d'albumine acéto-soluble.

Action du sulfate de magnésie à saturation.

Comme le sang n'est pas très acide et à peine alcalin, on peut ajouter directement du sulfate de magnésie à saturation ; il se forme un précipité. Il y

a donc, vraisemblablement, dans ce cas, de la globuline. En filtrant après 24 heures de contact la solution magnésienne, on obtient un liquide qui, par addition d'acide acétique et ébullition, forme un coagulum. *Nous concluons à la présence de sérine ou du moins à la présence d'une matière albuminoïde présentant les propriétés de la sérine.*

En résumé, les matières protéiques existant dans le sang sont : la GLOBULINE et la SÉRINE. Nous n'avons pas trouvé d'albumine acéto-soluble, de peptones et d'albumoses.

Détermination quantitative des albumines

Nous avons cherché à déterminer les variations du taux des albumines pendant le cours de l'année. Nous avons eu recours, pour ces dosages, à la méthode pondérale.

Nous avons, dans un premier dosage, déterminé la proportion d'albumine totale. Après précipitation des globulines par le sulfate de magnésie, nous avons, dans un second dosage, déterminé l'albumine restant, identifiable à la sérine, et par différence, nous avons obtenu les globulines.

Dosage de l'albumine totale

Nous avons opéré sur 5 centimètres cubes de sang, très exactement mesurés ; nous sommes en effet dans les conditions optima de dosage, le poids d'albumine recueillie ne dépassant pas 20 centigrammes.

Deux filtres Durieux pour analyse sont équilibrés, placés l'un dans l'autre, l'extérieur étant percé pour ne pas retarder la filtration. Aux 5 centimètres cubes de sang, placés dans un petit vase à précipité, on ajoute 10 centimètres cubes de solution d'acide trichloracétique au 1/5. On agite ; il se forme un abondant précipité, que l'on verse sur le filtre à l'aide d'un agitateur terminé par un bout de caoutchouc. On entraîne par de l'eau distillée tout le précipité, qui peut adhérer aux parois du vase. On lave plusieurs fois vase, précipité et filtre. On cesse le lavage quand le filtrat ne rougit plus un papier de tournesol. On porte alors les deux filtres et le précipité dans une étuve à eau bouillante. On dessèche ainsi le tout. On laisse à l'étuve jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de diminution de poids ; on sépare les deux filtres que l'on place sur chacun des plateaux d'une balance et on pèse le précipité. Ce poids multiplié par 200 donne le poids d'albumine totale au litre.

Dosage de la sérine

Dix centimètres cubes de sang sont placés dans un flacon jaugé de 100 centimètres cubes ; on ajoute 8 gr. de sulfate de magnésie. On agite, pour dissoudre. On complète à 100 centimètres cubes avec une solution saturée de sulfate de magnésie ; on mélange par agitation,

Après deux heures de contact, on filtre. Le liquide filtré passe incolore. 50 centimètres cubes de filtrat reçus dans un vase à précipité sont additionnés de 20 centimètres cubes d'acide trichloracétique au 1/3.

Il se forme un précipité. On verse le tout sur deux filtres équilibrés et placés l'un dans l'autre, comme pour le dosage précédent. On lave jusqu'à ce que le filtrat ne précipite plus par le chlorure de Ba. On dessèche à l'étuve, jusqu'à poids constant et on pèse. On ramène au litre en multipliant par 200.

Dosage des globulines

On obtient la proportion de globulines en faisant la différence entre l'albumine totale et l'albumine identifiable à la sérine.

Détermination sur des escargots

1° EN VIE ACTIVE. — Août 1924.

Poids de l'albumine totale de 5 centimètres cubes de sang	7 centigr. 86
Poids de l'albumine totale par litre :	
$7,86 \times 200$	15 gr. 72
Poids de l'albumine indentifiable à la sérine de 5 cent. cubes de sang.....	4 centigr. 8
Poids de l'albumine identifiable au litre : $4,8 \times 200$	9 gr. 6
Poids des globulines au litre : 15,72—9,6	6 gr. 12

Septembre 1924 :

Poids de l'albumine totale de 5 centimètres cubes de sang	7 centigr. 6
Poids de l'albumine totale par litre :	
$7,6 \times 200$	15 gr. 2
Poids de l'albumine identifiable à la sérine pour 5 cc. de sang	5 centigr.

Poids de l'albumine identifiable à la
sérine par litre : $0,05 \times 200$ 10 gr.
Poids des globulines par litre :
15 gr. 20 — 10..... 5 gr. 20

2° EN VIE RALENTIE. — Février 1925 :

Poids de l'albumine totale pour 5 cen-
timètres cubes de sang..... 0 gr. 175

Poids de l'albumine totale par litre :
 $0,175 \times 200$ 34 gr. 10

Poids de l'albumine identifiable à la
sérine pour 5 cc. de sang 6 centigr. 4

Poids de l'albumine identifiable à la
sérine par litre..... 12 gr. 80

Poids des globulines p. lit. : 34,10—12,80 21 gr. 30

3°) A DIFFÉRENTES DATES APRÈS LE RÉVEIL.

Les escargots se sont réveillés le 3 mai 1925. De-
puis cette date, ils ont été nourris avec de la salade
durant 25 jours. Quatre escargots nous ont donné
23 centimètres cubes de sang. Nous avons obtenu :

Albumine totale de 5 cc. de sang 7 centigr. 78

Albumine totale par litre : $7,78 \times 200$ 15 gr. 56

Albuminè identifiable à la sérine pour

5 cent. cubes de sang 3 centigr. 54

Albumine identifiable à la sérine p. lit. 7 gr. 08

Globulines par litre : 15,56 — 7,08 8 gr. 48

Le 18 juin 1925.

*Détermination sur le même lot d'escargots
après 45 jours de vie active*

Quatre escargots nous ont donné 22 cc. de sang.

Albumine totale de 5 cc. de sang....	7 centigr. 85
Albumine totale par litre	15 gr. 70
Albumine identifiable à la sérine pour	
5 cent. cubes de sang	3 centigr. 80
Albumine identifiable à la sérine p. lit.	7 gr. 60
Globulines par litre : 15,70 — 7,60...	8 gr. 10

4) EN VIE RALENTIE PROVOQUÉE ARTIFICIELLEMENT.

Sur une partie du lot d'escargots réveillés depuis le 3 mai, nous avons fait les expériences suivantes : après 5 jours de nourriture, nous les avons placés dans la glacière, de façon à les faire jeûner. Ils se sont operculés d'une mince membrane.

*Détermination faite le 28 mai sur les escargots
jeûnant depuis 20 jours*

Six d'entre eux nous ont donné 19 cc. de sang très bleu. Nous avons obtenu :

Albumine totale pour 5 cc. de sang..	19 centigr. 75
Albumine totale par litre	39 gr. 50
Albumine identifiable à la sérine pour	
5 cent. cubes de sang.....	4 mgr. 6
Albumine identif. à la sérine p. lit.	0 gr. 92
Globulines par litre : 39,50 — 0,92....	38 gr. 58

*Détermination faite le 18 juin
Les escargots ont jeûné 40 jours*

Quatre escargots nous ont donné 15 cc. de sang très bleu. Nous avons obtenu :

Albumine totale par 5 cc. de sang..	20 centigr. 5
Albumine totale par litre : $20,5 \times 200$	41 gr.
Albumine identifiable à la sérine par	

5 cent. cubes de sang.....	1 mgr. 6
Albumine identifiable à la sérine p. lit.	0 gr. 22
Globulines par litre : 41 — 0,22.....	40 gr. 78

Détermination faite le 18 juin sur des escargots nourris 25 jours au lieu de 5 et sacrifiés après 20 jours de jeûne.

Nous avons recueilli pour trois escargots 21 cent. cubes de sang. Nous avons obtenu :

Albumine totale de 5 cc. de sang....	8 centigr.
Albumine totale par litre	16 gr.
Albumine identifiable à la sérine....	1 centigr. 16
Albumine identifiable à la sérine p. lit.	2 gr. 32
Globulines par litre : 16 — 2,32.....	13 gr. 68

Nous trouvons donc, pour ce dernier lot nourri 25 jours et jeûnant 20 jours :

1° Un taux d'albumine totale inférieur à celui des lots précédents.

2° Plus de sérine par litre de sang que pour celui des animaux nourris 5 jours et jeûnant 20 jours. Il semble que l'*Helix pomatia* L a tendance à accumuler de la sérine pendant sa vie active.

CONCLUSIONS. — *Pendant la vie active, l'animal conserve un taux à peu près constant d'albumine totale. Le pourcentage de sérine semble augmenter progressivement du réveil à l'hibernation. En hibernation et période de jeûne, la concentration en albumine totale est variable ; elle va en augmentant du début à la fin. Le taux de globuline paraît augmenter aux dépens de celui de la sérine.*

Modifications in vitro des albumines

Nous avons tenu à suivre les modifications in vitro des albumines du sang.

Quarante centimètres cubes de sang d'été additionnés de 32 grammes de sulfate de magnésie, sont placés dans un ballon jaugé de 200 cc. on complète après agitation à 200, avec de l'eau saturée de sulfate de magnésie. Nous avons dosé sur 50 cc. de solution la sérine, au bout d'une heure. Nous avons obtenu 10 gr. 8 de sérine par litre de sang. Au bout d'un jour, sur 50 cc. de solution, nous avons trouvé 9 gr. 6 par litre de sang. Le reste de la solution a été placé dans un flacon bouchant à l'éméri.

Après vingt jours, en opérant sur 50 cc. de solution, nous avons trouvé un taux de sérine égal à 3 gr. 30 par litre de sang.

CONCLUSIONS. — *La sérine diminue in vitro avec le temps et se transforme en substance précipitable par le sulfate de magnésie, comme la « globuline ».*

REMARQUE. — Enfin, cette modification des albuminoïdes est accompagnée d'une dégradation du pigment coloré ; en effet, si l'on traite du sang fraîchement prélevé par une solution de sulfhydrate d'ammoniaque, aucune réaction colorée n'apparaît. Au contraire, si l'on opère sur du sang prélevé depuis longtemps, quatre à cinq mois, par exemple, mais conservé en présence de toluène, une coloration d'un beau vert olive prend naissance et, au bout de 24 heures, un précipité noir abondant s'est formé. Nous nous trouvons donc en présence d'une modification profonde des protéines.

F. — Azote

L'azote existe dans le sang sous la forme protéïque et non-protéïque. Il nous a paru utile, après l'étude que nous venons de faire de ces corps azotés, de voir la variation du taux d'azote dans les différents états de vie de l'animal.

Pour cela, nous avons dosé, d'une part, l'azote non-protéïque; d'autre part, l'azote total. Par différence, nous avons obtenu l'azote protéïque.

L'azote résiduel est l'azote non protéïque, diminué de l'azote uréique. Dans le cas présent, nous pouvons confondre azote non-protéïque et azote résiduel, n'ayant pas trouvé d'urée dans le sang de l'*Helix pomatia* L.

Dosage de l'azote non protéïque du sang

Nous avons utilisé le procédé de GRIGAUT et THIERY.

Il repose sur l'emploi du réactif de NESSLER pour la détermination de la quantité d'ammoniaque formée dans le procédé KJELDHAL.

Réactifs :

1° *Solution d'acide trichloracétique à 20 %*

2° *Liqueur cuprosulfurique*

Acide sulfurique à 66° B..... 100 cmc.

Solution de sulfate de cuivre`

à 1/200..... 100 cmc.

3° Réactif de Nessler (formule modifiée)

Iodure de potassium.....	12 gr.
Bi-iodure de mercure.....	15 gr.
Lessive de soude à 36° B.....	180 cmc.
Eau distillée q. s. p.....	1000 cmc.

Dans quelques centimètres cubes d'eau, faire dissoudre l'iodure de potassium et le bi-iodure de mercure. Étendre la solution jusqu'à 50 centimètres cubes, filtrer et ajouter au filtrat la lessive de soude et le reste de l'eau distillée. Laisser en repos pendant quelques jours et décanter au moment du besoin la quantité nécessaire de réactif. N'utiliser que parfaitement clair et limpide.

4° Solution étalon de sulfate d'ammoniaque

Dissoudre 4 gr. 716 de sulfate d'ammoniaque pur et desséché dans un litre de solution d'acide sulfurique N/5, pour empêcher le développement des moisissures.

Prélever 10 centimètres cubes de cette solution et les étendre à un litre. On obtient ainsi une solution-étalon de sulfate d'ammoniaque, dont chaque centimètre cube correspond à 1/100 de milligramme d'azote (0,000,01).

TECHNIQUE. — Désalbuminer le plasma ou le sérum en l'additionnant de son volume d'acide trichloracétique à 20 % ; agiter et filtrer.

Dans un grand tube à essai, en verre ordinaire, ou mieux, en Pyrex, mesurer 2 cmc. de filtrat, correspondant à 1 centimètre cube de sérum, puis 1 cmc. de liqueur cuprosulfurique et une perle de verre.

Chauffer le tube à essai, maintenu par un support, d'abord fortement pour éliminer l'eau, puis plus doucement, lorsque la masse charbonne. Continuer de chauffer jusqu'à décoloration complète. Le mélange ne garde plus alors qu'une légère teinte bleue due à la présence du cuivre.

Laisser refroidir et entraîner le contenu du tube, au moyen d'eau distillée, dans un ballon portant deux traits de jauge, l'un pour 80 centimètres cubes, l'autre pour 100 centimètres cubes. Compléter le volume à 80 centimètres cubes avec de l'eau distillée.

Dans un second ballon, semblable au précédent, mesurer 25 centimètres cubes de la solution-étalon de sulfate d'ammoniaque puis un centimètre cube de liqueur cuprosulfurique et q. s. d'eau distillée pour 80 centimètres cubes.

Compléter ensuite le volume des deux ballons à 100 centimètres cubes avec le réactif de NESSLER et mélanger. Comparer ensuite les deux teintes au colorimètre ;

Comme la solution-étalon de sulfate d'ammoniaque correspond à 0 gr. 25 d'azote par litre, la teneur en azote de la solution à titrer, exprimée en centigrammes par litre, sera donnée par la formule suivante dans laquelle h est l'épaisseur de la couche du liquide correspondant à l'étalon et h' celle qui correspond au liquide à titrer, quand l'égalité des teintes est obtenue :

$$x = \frac{h \times 25}{h'}$$

Dosage de l'azote non-protéïque du sang de l'*Helix pomatia* L en vie latente :

Février 1925.

$$h = 20. \quad h' = 14.$$

$$x = \frac{20 \times 25}{14} = 0 \text{ gr. } 357 \text{ par litre.}$$

Dosage de l'azote non-protéïque du sang de l'*Helix pomatia* L en vie active :

Mai 1925.

$$h = 20. \quad h' = 40.$$

$$x' = \frac{20 \times 25}{40} = 0 \text{ gr. } 12 \text{ par litre.}$$

Dosage de l'azote total du sang

Nous avons effectué le dosage de l'azote total par le même procédé en opérant sur du sang non déféqué, mais dilué au 1/25.

Un centimètre cube de sang, très exactement mesuré, à l'aide d'une pipette soigneusement vérifiée, est placé dans un flacon jaugé à 25 cc. On complète par de l'eau distillée. On mélange et on opère avec 1 cc. de cette solution, comme avec les deux centimètres cubes de filtrat de l'opération précédente. On obtient le taux d'azote par litre de sang en multipliant par 25 le résultat.

DOSAGE DE L'AZOTE DU SANG DE L'*HELI*X POMATIA L EN HIBERNATION

Février 1925.

$$h = 20. \quad h' = 23.$$

$$x = \frac{20 \times 25}{23} = 0,2174$$

Azote total par litre de sang :

$$0,2174 \times 25 = 5 \text{ gr. } 425$$

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL DU SANG
DE L'*HELIIX POMATIA L* EN VIE ACTIVE

Mai 1925.

$$h = 20. \quad h' = 54.$$

$$x = \frac{20 \times 25}{54} = 0,0926$$

Azote total par litre de sang :

$$0,0926 \times 25 = 2 \text{ gr. } 315$$

Azote protéïque

On l'obtient, par différence entre l'azote total et l'azote non-protéïque :

Azote protéïque de l'animal en vie latente

Février 1925.

$$5,425 - 0,357 = 5 \text{ gr. } 068 \text{ p. lit. de sang.}$$

Azote protéïque de l'animal en vie active

Mai 1925.

$$2,315 - 0,12 = 2 \text{ gr. } 195 \text{ p. lit. de sang.}$$

En comparant le poids de l'azote protéïque par litre de sang au poids des albumines, nous voyons qu'il entre dans les proportions de :

en vie latente

$$\frac{34,10}{5,068} = 6,73, \text{ soit } 14,9 \% \text{ de matières albuminoïdes}$$

en vie active

$$\frac{15,56}{2,195} = 7,01, \text{ soit } 14,3 \% \text{ de matières albuminoïdes}$$

CONCLUSIONS. — 1° *L'azote non-protéïque semble exister dans le sang de l'Helix pomatia L en plus grande proportion en vie latente qu'en vie active.*

2° *Il est constitué par de l'azote résiduel.*

3° *L'azote protéïque atteint un taux plus élevé en vie latente qu'en vie active et suit les variations de la concentration en albumines.*

4° *Les protéïnes du sang semblent contenir sensiblement 15 % d'azote.*

INFLUENCE DE LA SECHERESSE SUR LE SANG DE L'*HELI*X *POMATIA* L

L'Helix pomatia L, sous l'influence de l'élévation de température et de la sécheresse, s'opercule d'une mince paroi non calcifiée et entre en vie latente. Des modifications dans la constitution, du sang en particulier, suivent cet état de vie de l'animal.

Nous nous étions promis de déterminer les variations des constituants, mais cet été, très pluvieux, ne nous a pas permis d'avoir des escargots operculés naturellement.

Nous avons pensé à provoquer artificiellement cet état de vie latente.

Nous avons placé pendant quatre jours dans une étuve, dont la température était maintenue à 30°, une cloche contenant une centaine d'escargots. Nous avons placé, à l'abri de toute atteinte des animaux, deux petits cristallisoirs. Dans l'un, nous avons mis du carbonate de potasse anhydre, pour maintenir

sèche l'atmosphère de la cloche ; dans l'autre, de la potasse caustique, pour fixer le gaz carbonique émis par la respiration des escargots. De plus, comme l'enceinte était absolument close, nous avons aéré la cloche une fois par jour. Au bout des quatre jours, nous avons constaté que plusieurs escargots étaient operculés, d'autres n'avaient pas encore secrété d'opercule, enfin, une grande partie du lot avait succombé pendant la durée de l'expérience. Sur les escargots operculés, et sur ceux-là seulement, nous avons prélevé le sang pour l'examen. L'aspect de ce dernier est à peu près analogue au sang d'été et ne présente pas à première vue de particularités bien distinctives.

Nous avons, par les procédés exposés plus haut, déterminé : 1° la densité; 2° l'extrait sec; 3° les cendres.

Densité

Le flacon de Regnault qui nous avait servi, rempli d'eau distillée jusqu'au trait de jauge et maintenu à zéro dans la glace fondante, pèse 53 gr. 78. Vide et bien desséché, il pèse 33 gr. 143 ; la densité de l'eau à zéro degré étant de 0,999871, le volume du flacon à zéro est

$$V^0 = \frac{53,178 - 33,143}{0,999871} = 20,0375$$

Le poids du flacon rempli jusqu'au trait de jauge de sang à étudier est $p = 53,483$.

Le poids du sang utilisé pour la détermination est $p - P = 53,483 - 33,143 = 20 \text{ gr. } 340$.

La densité à zéro degré du sang de l'*Helix pomatia* L, en vie latente estivale, est donc :

$$\frac{20,340}{20,0375} = 1,0151$$

CONCLUSION. — *Le sang a une densité plus grande en vie latente estivale qu'en vie active.*

Extrait sec à 100°

20 cc. de sang sont placés dans une capsule tarée. On maintient à l'étuve à 100° pendant 6 heures environ, jusqu'à ce que le poids de la capsule ne varie plus. On laisse refroidir dans un exsiccateur à acide sulfurique et on pèse.

Poids de la capsule vide..... 35 gr. 392

Poids de la capsule et de l'extrait.... 35 gr. 920

Poids de l'extrait sec à 100°, par litre :

$$0 \text{ gr. } 528 \times 50 = 26 \text{ gr. } 40$$

CONCLUSION. — *L'extrait sec augmente par litre de sang pendant cette vie latente provoquée par la sécheresse.*

Cendres

L'extrait sec de la détermination précédente est calciné jusqu'à poids constant, sans dépasser le rouge sombre.

Poids de la capsule et des cendres de

20 cc..... 35 gr. 496

Poids des cend. de 20 cc. 35,496—35,392= 0 gr. 104

Poids des cendres par litre 0,104 $\times$ 50= 5 gr. 20

CONCLUSIONS. — *Les cendres, comme l'extrait sec, augmentent par litre de sang pendant celle vie latente provoquée par la sécheresse. Le sang semble, dans ce cas, subir une simple déshydratation.*

CONCLUSIONS

I. — Le PH du sang d'*Helix pomatia* L est sensiblement constant en hiver et en été.

II. — Les points de congélation observés varient dans le même sens que la concentration. Aussi le sang d'hiver se congèle à température plus basse que le sang d'été. La viscosité varie de la même façon, ainsi que la densité. Par contre la conductivité est plus faible en hiver qu'en été.

III. — Le sang d'*Helix pomatia* L en vie active ou en vie ralentie, renferme les éléments minéraux suivants : Chlore, soufre, phosphore, calcium, magnésium, sodium, potassium et, à l'état de traces, le lithium. Nous avons déterminé les quantités de la plupart d'entre eux. Dans le sang prélevé en vie ralentie, ces éléments se rencontrent en quantité plus grande que dans le sang d'été. Il ne paraît pas y avoir de rapport fixe.

IV. — Le glucose, ou mieux, les matières réductrices libres, ne se rencontrent pas en quantité appréciable. Par contre, il existe une assez forte proportion de sucre combiné, dosable après hydrolyse sulfurique des protéines.

V. — Le pouvoir glycolytique du sang ne paraît pas être nul, mais, en tout cas, il est très faible.

VI. — L'urée n'a pas pu être décelée en quantité appréciable ni par les méthodes volumétriques, ni par les méthodes gravimétriques.

VII. — La cholestérine de l'*Helix pomatia* L est, en tout point, comparable à la cholestérine des mammifères.

VIII. — Les albumines sont constituées par un mélange de globulines et d'une protéine assimilable à la sérine. Le sang d'hiver est beaucoup plus riche en albumines totales que le sang d'été. Il paraît renfermer plus de globuline.

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Botanique. . . **Les Phytostérines.**

Géologie. . . **Les Feldspaths des roches.**

Lu et accepté :

Les Membres du Jury,
COUVREUR
BEAUVÉRIE
ROMAN F.

Vu et approuvé :

Le Doyen
de la Faculté des Sciences,
Membre de l'Institut,
DEPÉRET

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
CAVALIER

BIBLIOGRAPHIE

1. ANGLAS J. — L'Escargot, anatomie et dissection.
2. BELLION Marguerite. — Diminution du sucre chez l'escargot (*Helix pomatia* L) pendant la période d'activité. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 27 juillet 1907.
3. BELLION M. — Contribution à l'étude de l'hibernation chez les invertébrés. Recherches expérimentales sur l'hibernation de l'escargot (*Helix pomatia* L).
4. BERT Paul. — De la respiration.
5. BIERRY et PORTIER. — Sur le dosage du sucre du sang. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 15 novembre 1902.
6. BOTTAZZI Filippo. — Réduction de l'oxyhémocyanine par les moyens physiques et biologiques. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1919-20, page 1.
7. CAMUS L. — Sang d'escargot et coagulation. *Comptes rendus et mémoires de la Société de Biologie*, 1900, page 495.
8. CLUZET. — Précis de Physique médicale.
9. COUVREUR E. — Note sur le sang d'escargot. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 28 avril 1900, page 395.
10. COUVREUR E. — Sur le sang des mollusques, Gasteropodes Marins. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1902, page 1251.
11. COUVREUR et L. ROUQUIER. — Hémocyanine, ses dérivés. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1902, page 1476.

12. COUVREUR E. — Hémocyanine. *Bulletin de Biologie de France et de Belgique*, 1903, page 1247.
13. COUVREUR E. — A propos de la note de M. DHÉRÉ sur l'hémocyanine. *Comptes rendus et mémoires de la Société de Biologie*, 18 juillet 1903, page 1247.
14. COUVREUR et BELLION M. — Sur le sucre du sang d'escargot. *Comptes rendus et mémoires de la Société de Biologie*, 19 octobre 1907.
15. COUVREUR et BELLION M. — Sur le sucre du sang d'escargot. Réponse à M. G. SEILLIÈRE. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 15 février 1908.
16. COUVREUR et BELLION M. — Sur le sucre du sang d'escargot. Nouvelle réponse à M. G. SEILLIÈRE. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 11 avril 1908.
17. COUVREUR E. — Sur le sucre du sang d'escargot. Nouvelle réponse à M. G. Seillière. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 11 avril 1908.
18. DAMBEAUVICÉANU. — Recherches sur quelques constituants physico-chimiques du sang d'Hélix pomatia L. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 23 juin 1923, page 261.
19. DHÉRÉ Charles. — Dosage du cuivre dans les recherches biologiques. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1900, page 456.
20. DHÉRÉ (Charles). — Le cuivre hématique des invertébrés et la capacité respiratoire de l'hémocyanine. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1900, page 458.
21. DHÉRÉ Charles. — Action de la chaleur et de l'alcool sur l'hémocyanine. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1903, page 1012.
22. DHÉRÉ Charles. — Remarque sur la note de M. COUVREUR. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1903, page 1338.
23. DHÉRÉ et VEGEZZI. — Sur l'hémochromogène acide. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 3 juillet 1916.

24. DHÉRE et VEGEZZI. — Influence exercée par les degrés de réduction des hémochromogènes sur leurs propriétés spectrales. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 21 août 1916.
25. DHÉRE Charles. — Nouvelles recherches sur l'hémochromogène acide. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 16 décembre 1916.
26. DHÉRE et VEGEZZI. — Sur l'hélicorubine. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 25 mai 1917.
27. DHÉRE BAUDOUN et SCHNEIDER. — Sur la cristallisation de l'hémochromogène acide. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 15 octobre 1917.
28. DHÉRE et BURDEL. — Sur l'absorption visible de l'oxyhémocyanine. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1919-1920, page 685.
29. DHÉRE Charles. — Teneur en cuivre et capacité respiratoire des sangs hémocyaniques. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1919-1920, page 221.
30. DHÉRE Charles. — Cristallisation de l'hémocyanine. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1919-1920, page 503.
31. DHÉRE et SCHNEIDER. — Appareils pour l'action des gaz sur les pigments respiratoires.
32. DHÉRE et SCHNEIDER. — Sur la dissociation de l'oxyhémocyanine.
33. DHÉRE et SCHNEIDER. — Sur une combinaison de l'hémocyanine de l'escargot avec le bioxyde d'azote.
34. DHÉRE Charles. — Spectre ultra-violet de l'hémocyanine influence du cuivre sur les bandes d'absorption. *Journal de Physiologie et Pathologie générale*, 1919-1920, page 1081.
35. DUBOIS Raphaël. — Sur le cuivre normal dans la série animale. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1900, page 392.
36. FOSSE. — Origine et distribution de l'urée dans la nature, application de nouvelles méthodes d'analyses de l'urée basées sur l'emploi du xanthidrol. *Annales de chimie*, juillet-août, tome VI.

37. FRÉDÉRICQ Léon. — Sur l'hémocyanine substance nouvelle du sang du poulpe (*Octopus Vulgaris*). *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 1878, LXXXVII, page 996.
38. FRÉDÉRICQ Léon. — Sur la conservation de l'hémocyanine. *Travaux du Laboratoire de Liège*, 1889, tome III, page 194.
39. FRÉDÉRICQ Léon. — Sur l'hémocyanine. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 4 juillet 1892, CXV, page 61.
40. GRIFFITHS. — Formule de l'hémocyanine. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 29 février 1892, CXIV, page 496.
41. GRIFFITHS. — Sur la composition de la pinnaglobuline, une nouvelle globuline. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 4 avril 1892, CXIV, pages 840-842.
42. GRIFFITHS. — Composition de l'hémocyanine. *Bulletin Archives Bruxelles*, 1892, XXIII, pages 842-844.
43. GUIART et GRIMBERT. — Diagnostic chimique microscopique et parasitologique.
44. GUÉNOT. — La valeur respiratoire de l'hémocyanine. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 11 juillet 1892, CXV, pages 127-129.
45. GUÉNOT. — Etude sur le sang et les glandes lymphatiques des invertébrés (*Archives de Zoologie expérimentale*, 1891).
46. HEIM. — Sur la matière colorante bleue du sang des crustacés. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 1892, CXIV, pages 771-774.
47. HEIM. — Etude du sang des crustacés décapodes, 1892.
48. HUGOUNENQ L. — Précis de chimie physiologique et pathologique.
49. KOPACZEWSKI. — Théorie et pratique des colloïdes en biologie et en médecine, 1923.
50. LAMBLING. — Précis de biochimie.
51. LÉPINE R. et BOULUD. — Sur le sucre virtuel du sang. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 21 septembre 1903.

52. LÉPINE R. et BOULUD. — Sur le sucre virtuel du sang. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 2 novembre 1903.
53. LÉPINE R. et BOULUD. — Sur le sucre virtuel du sang. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 8 octobre 1906.
54. LÉPINE R. — Extraction du sucre du sang. *Bulletin de la Société chimique*, 1907.
55. LÉPINE R. et BOULUD. — Sur le sucre total du sang. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 27 juillet 1908.
56. LÉPINE R. et BOULUD. — Sur le sucre total du sang. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 30 novembre 1908.
57. LÉPINE R. — Le sucre du sang, 1921.
58. MAUREL. — Influence de la température ambiante sur les dépenses de l'organisme chez les animaux à température variable pendant le sommeil. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 6 octobre 1900, page 938.
59. MICHAELIS Léonor. — Manuel de techniques de physico-chimie et spécialement chimie de colloïdes à l'usage des médecins et biologistes.
60. MOREL Albert. — Précis de technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux.
61. PACAUT Maurice. — Sur 2 propriétés diastasiques de la salive de l'escargot (*Hélix pomatia* L.). *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1^{er} juillet 1905.
62. PHISALIX. — Hémocyanine réduction dans le sang d'escargot. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1900, page 729.
63. PHISALIX. — Observation sur le sang d'escargot. *Bulletin de Biologie*, 1900. pages 729-732.
64. PIETTRE. — Séparation des protéïdes du blanc d'œuf par la méthode à l'acétone. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 2 janvier 1924.
65. RICHET. — Dictionnaire article glycolyse.

66. RICHET. — *Dictionnaire article hémocyanine*, page 507.
67. SEILLIÈRE Gaston. — Sur la présence d'une diastase hydrolysant la xylane dans le suc gastro-intestinal de l'escargot. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 4 mars 1905.
68. SEILLIÈRE Gaston. — Sur la présence de la xylanase chez différents mollusques gastéropodes. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 1^{er} juillet 1905.
69. SEILLIÈRE Gaston. — Remarque sur l'hydrolyse diastatique de quelques pentosanes. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 30 juin 1906.
70. SEILLIÈRE Gaston. — Recherches des pentoses par la réaction à la phloroglucine. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 7 décembre 1907.
71. SEILLIÈRE Gaston. — Sur la présence du sucre dans le sang d'escargot. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*. 21 mars 1908.
72. SEILLIÈRE Gaston. — Objections à la note de M. E. COUVREUR et Mlle M. BELLION sur le sucre du sang de l'escargot. Réponse à M. SEILLIÈRE. *Comptes rendus et Mémoires de la Société de Biologie*, 4 mars 1908.
73. WEYL Th. et CORNUBERT. — Les méthodes de la chimie organique.
-

